

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



TESIS DOCTORAL

Cambios estructurales en los aneurismas de aorta abdominal.

Estudio proteómico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Miguel Muela Méndez

Directores

Guillermo Moñux Ducajú
Francisco Javier Serrano Hernando
Antonio José López Farré

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LOS
ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL.
ESTUDIO PROTEÓMICO**

TESIS DOCTORAL

MIGUEL MUELA MÉNDEZ

MADRID, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA



**CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LOS ANEURISMAS DE
AORTA ABDOMINAL. ESTUDIO PROTEÓMICO**

TESIS DOCTORAL

MIGUEL MUELA MÉNDEZ

DIRECTORES DE TESIS:

GUILLERMO MOÑUX DUCAJÚ

FRANCISCO JAVIER SERRANO HERNANDO

ANTONIO JOSÉ LÓPEZ FARRÉ

MADRID, 2014

"Cree a aquellos que buscan la verdad.

Duda de los que la encuentran".

André Gide (1869-1951).

"Si no puedes convencerlos, confúndelos".

Harry Truman (1884-1972).

A Patricia, la mejor compañera

y apoyo incondicional

A mis padres, por darlo todo por mí

A Itziar, porque por ella lo daré todo

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todos los que, de una forma u otra, directa o indirectamente, han ayudado a que esta tesis doctoral salga a la luz:

- Al Dr. Guillermo Moñux Ducajú, por su perseverancia, su apoyo y su disponibilidad para todo, pese al poco tiempo libre del que dispone. Sin él esta tesis no se habría realizado.
- Al Dr. Francisco Javier Serrano Hernando, referente personal y profesional, al que aprecio y admiro a partes iguales, y del que he aprendido los mejores valores profesionales.
- A todos los componentes del servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Clínico San Carlos de Madrid (jefe de servicio, adjuntos, residentes mayores, residentes pequeños, enfermeras y personal administrativo), porque a ellos debo todo lo que he aprendido de la profesión a la que me dedico, y a los que me une una gran amistad.
- A la Dra. Mercedes Guerra Requena, Dra. Beatriz García Fresnillo, Dra. Estrella Blanco Cañibano, y Dra. Caridad Morata Barrado, jefe de

servicio y facultativos del servicio de Angiología y Cirugía Vascular del Hospital Universitario de Guadalajara, por acogerme con los brazos abiertos, brindarme toda la ayuda que he necesitado, y permitirme utilizar ese rincón del despacho donde se ha forjado esta tesis.

- A la Dra. Sara González Sánchez, por precederme en este camino y servirme de ayuda, guía e inspiración. Jamás podré compensárselo lo suficiente.
- A todos los componentes de la Unidad de Investigación Cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, en especial a los doctores Javier Mordrego y Antonio López Farré, por el impresionante trabajo realizado, la ayuda, los consejos y correcciones prestadas.
- Y por supuesto a mi familia (mi mujer, mi hija, mis padres, hermanos, cuñados y sobrinos), que siempre me han apoyado en mi carrera profesional, y han sabido entender que en estos últimos meses haya estado algo ausente.

A todos vosotros, sinceramente y desde el corazón;

Muchísimas gracias

ABREVIATURAS

- 2-DE: Electroforesis bidimensional.
- AAA: Aneurisma de aorta abdominal.
- AAAP: *Aneurysm associated protein*; proteína asociada a los aneurismas.
- ABD: *Actin-binding-domain*, dominio de unión a actina.
- ABP: *Actin-binding protein*, proteína de unión a la actina.
- ADP: Adenosín difosfato.
- Arg: Arginina.
- ATP: Adenosín trifosfato.
- BCA: Ácido bicinconínico.
- BSA: Albúmina de suero bovino.
- DE: Desviación estándar.
- DBP: *Vitamin D binding protein*; proteína de unión a la Vitamina D.
- DMSO: dimetilsulfóxido.
- EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.
- EGR-1: *Early growth response factor-1*, Factor temprano de respuesta al crecimiento-1.

- ELISA *Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*.
- EVAR: *Endovascular aortic aneurysm repair*, reparación endovascular de aneurisma aórtico.
- FACIT: *Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple-helices*
- Gly: Glicina.
- HRP, *horseradish peroxidase*, peroxidasa de rábano.
- IPG: *Isoelectric Phocusing Gradient*,
- IRC: Insuficiencia renal crónica.
- Lys: Lisina.
- MAGP: *Microfibril-Associated Glycoprotein*, glicoproteína asociada a microfibrillas.
- MALDI: *Matriz-Assisted Laser Desorption/Ionization*.
- MFAP: *Microfibril-Associated protein*, proteína asociada a microfibrillas.
- MMP: *Matrix metalloproteinase*, metaloproteinasa de la matriz
- MS: *Mass Spectrometry*, espectrometría de masas.
- PMSF: fenilmetil sulfonil fluoruro.
- PVDF: *Polyvinylidene difluoride*, fluoruro de polivinilideno.
- ROS: *Reactive Oxygen species*, especies reactivas de oxígeno.
- TAC: Tomografía axial computarizada.
- TFA: *TriFluoroAcetic acid*, ácido trifluoroacético.
- TGF: *Transforming growth factor*, factor de crecimiento transformante.
- TIMP: *Tissue inhibitor of metalloproteinase*, inhibidor tisular de la metaloproteinasa.
- TNF: Factor de necrosis tumoral.
- TOF: *Time of Flight*, tiempo de vuelo.

- t-PA: Activador tisular del plasminógeno.
- RMN: Resonancia magnética nuclear.
- UA: Unidades Densitométricas Arbitrarias.
- WB: Western blot.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	18
I.A. Aneurismas de aorta abdominal.	18
I.A.1. Definición de aneurisma arterial.	18
I.A.2. Aneurismas inespecíficos de la aorta abdominal	21
I.A.3. Epidemiología	21
I.A.4. Clínica	22
I.A.5. Diagnóstico	24
I.A.6. Historia natural de los aneurismas de aorta abdominal.	27
I.A.7. Tratamiento	29
I.B. Patogenia de los AAA.	32
I.B.1. Teoría arterioesclerótica.	32
I.B.2. Teoría mecánica.	33
I.B.3. Teoría inmunogenética	34
I.B.3.1. Introducción.	34
I.B.3.2. Diferencias entre los AAA y la arteriosclerosis aórtica.	34
I.B.3.3. Papel de las metaloproteinasas.	39
I.B.3.4. Teoría actual sobre la patogenia de los AAA.	41
I.C. Estructura de la pared aórtica.	43
I.C.1. Anatomía de la pared arterial.	43

I.C.2. Proteínas estructurales de la pared arterial.	47
I.C.2.1. Colágeno.	49
Colágenos tipo I, II, III, V y XI	53
Colágenos tipo IX, XII y XIV - Los colágenos FACIT	55
Colágeno tipo VI - Un colágeno microfibrilar	57
Colágenos VIII y X - Colágenos de cadena corta.	57
Colágeno tipo IV - el colágeno de las membranas basales.	58
Colágeno tipo VII - fibras de anclaje.	59
I.C.2.2. Elastina.	60
I.C.2.3. Fibrilina y glicoproteínas asociadas a microfibrillas.	62
I.C.2.4. Actina.	66
I.C.2.5. Filamina.	69
I.C.2.6. Tropomiosina.	72
I.C.2.7. Vimentina.	73
I.C.2.8. Anexinas.	74
I.C.2.9. Bcl-2.	77
I.D. Proteómica.	81
I.D.1. Fundamentos de la técnica.	85
I.D.1.1. Electroforesis bidimensional.	85
I.D.1.1.a) Preparación de las muestras.	87
I.D.1.1.b) Primera dimensión.	88
I.D.1.1.c) Segunda dimensión.	88
I.D.1.1.d) Detección de las proteínas.	88
I.D.1.2. Análisis de la imagen.	89
I.D.1.3. Espectrometría de masas (MS).	90
II. HIPÓTESIS	92
III. OBJETIVOS	94
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	96

IV.A.	Obtención de muestras aórticas. -----	96
IV.B.	Determinación de proteínas mediante proteómica.-----	98
IV.B.1.	Electroforesis bidimensional (2-DE). -----	98
IV.B.1.1.	Material utilizado.-----	99
IV.B.1.2.	Preparación de las muestras.-----	99
IV.B.1.3.	Primera dimensión. -----	101
IV.B.1.4.	Segunda dimensión.-----	106
IV.B.1.5.	Tinción.-----	107
IV.B.1.6.	Adquisición de imágenes y análisis. -----	108
IV.B.2.	Espectrometría de masas. -----	110
IV.B.2.1.	Material utilizado.-----	110
IV.B.2.2.	Método.-----	111
IV.B.3.	Western blot. -----	115
IV.B.3.1.	Material utilizado.-----	116
IV.B.3.2.	Preparación de las muestras.-----	117
IV.B.3.3.	Electroforesis en gel. -----	118
IV.B.3.4.	Transferencia y bloqueo de las proteínas. -----	119
IV.B.3.5.	Detección de proteínas. -----	123
IV.B.3.6.	Análisis. -----	124
IV.B.4.	ELISA. -----	125
IV.B.4.1.	Material utilizado.-----	128
IV.B.4.2.	Preparación del material del ensayo. -----	129
IV.B.4.3.	Protocolo del ensayo. -----	132
IV.B.4.4.	Procesamiento de los datos. -----	133
IV.C.	Estudio estadístico.-----	134
V.	RESULTADOS -----	136
V.A.	Características basales de los pacientes y los controles. -----	136
V.B.	Diferencias en las proteínas de la matriz extracelular. -----	139

V.C. Diferencias en las proteínas asociadas con el citoesqueleto. -----	139
V.D. Diferencias en proteínas relacionadas con la apoptosis celular. -----	142
VI. DISCUSIÓN -----	143
VI.A. Estudios previos de proteómica en AAA.-----	143
VI.A.1. Urbonavicius et al, 2009 -----	144
VI.A.2. Urbonavicius et al, 2010 -----	146
VI.A.3. Ando et al, 2011-----	150
VI.A.4. Molacek et al, 2014 -----	152
VI.B. Expresión diferencial de proteínas en aorta sana y aorta aneurismática.-----	153
VI.B.1. Proteínas de la matriz extracelular.-----	153
VI.B.2. Proteínas asociadas con el citoesqueleto. -----	155
VI.B.3. Proteínas relacionadas con la apoptosis celular. -----	158
VI.C. Limitaciones del estudio. -----	160
VII. CONCLUSIONES -----	167
VIII. BIBLIOGRAFÍA -----	166
IX. RESUMEN -----	191
X. SUMMARY -----	194

I. INTRODUCCIÓN

I.A. Aneurismas de aorta abdominal.

I.A.1. Definición de aneurisma arterial.

Se denomina aneurisma a una dilatación localizada y permanente de una arteria que la lleva a tener un diámetro igual o superior al 150% del diámetro del segmento arterial adyacente sano. Pueden ocurrir en cualquier arteria del organismo, siendo la aorta abdominal la localización más frecuente ⁽¹⁾.

La clasificación de los aneurismas se realiza habitualmente según su etiopatogenia, y ha sufrido cambios sobre todo desde los años 80 a raíz de la aparición de nuevas publicaciones sobre la etiología de los aneurismas. En la Tabla 1.1 se muestra la clasificación etiológica propuesta por la Sociedad de Cirugía Vascular/Sociedad Internacional de Cirugía Cardiovascular (SVS/ISCVS) a través del subcomité de estándares para la publicación sobre aneurismas arteriales ⁽²⁾.

El tipo de aneurisma más frecuentemente visto en la práctica clínica diaria es el de tipo degenerativo (también llamado inespecífico o aterosclerótico). Esta tesis doctoral versará sobre ese tipo de aneurisma, concretamente los de localización en la aorta abdominal infrarrenal.

1. Congénitos
Alteraciones primarias del tejido conectivo
Síndrome de Marfan
Síndrome de Ehler-Danlos
Otros
Agnesia focal de la media
Esclerosis tuberosa
Síndrome de Turner
Síndrome de Mankes
2. Hemodinámicos
Aneurismas post-estenóticos
Derivados de las fistulas arteriovenosas
3. Traumáticos (pseudoaneurismas)
Lesiones penetrantes en las arterias
Lesiones contusas en las arterias
4. Derivados de enfermedades inflamatorias
Asociados a arteritis
Enfermedad de Takayasu
Arteritis de células gigantes
Lupus eritematoso sistémico
Síndrome de Beçhet
Enfermedad de Kawasaki
Inflamación peri-arterial (p.e pancreatitis)
5. Aneurismas infecciosos (aneurismas micóticos)
Secundarios a infección bacteriana
Secundarios a infección por hongos
Secundarios a infección por espiroquetas
6. Relacionados con el embarazo (p.e aneurismas esplénicos)
7. Degenerativos
Inespecíficos (antiguamente denominados arterioescleróticos)
Variante inflamatoria
8. Anastomóticos (post-arteriotomía)
Infección
Fracaso de la pared arterial
Fracaso de la sutura
Fracaso de la prótesis

Tabla 1.1: Clasificación etiológica de los aneurismas arteriales.

I.A.2. Aneurismas inespecíficos de la aorta abdominal

Como hemos mencionado con anterioridad, los aneurismas inespecíficos de aorta abdominal infrarrenal constituyen la forma más frecuente de enfermedad aneurismática no traumática. La denominación clásica de aneurismas "ateroscleróticos" es debida a que se consideraba la aterosclerosis como el principal factor etiopatogénico ⁽³⁾. Sin embargo en estudios más recientes se encuentran evidencias de que la aterosclerosis en los aneurismas es un proceso secundario ⁽⁴⁾.

Teniendo en cuenta que el diámetro normal de la aorta infrarrenal es de 2.3 cm en varones y 1.9 cm en mujeres ⁽⁵⁾, de acorde con la definición de aneurisma la aorta abdominal se considerará aneurismática cuando su diámetro máximo supere los 3 cm.

I.A.3. Epidemiología

Los aneurismas de aorta abdominal (AAA) afectan fundamentalmente a pacientes mayores de 50 años, con una prevalencia de 2 a 6 veces mayor en hombres que en mujeres, y de 2 a 3 veces más frecuente en la raza caucásica respecto a la negra ^{(6), (7), (8)}. La prevalencia de los aneurismas de aorta abdominal en la población mayor de 65 años es de 7.6% para hombres y 1.3% para mujeres según un estudio realizado por Scott et al en la población de Reino Unido mediante screening de 5394 personas sin sospecha de patología aórtica ⁽⁹⁾. Estudios más recientes cifran la prevalencia global de aneurisma de aorta abdominal entre el 5 y el 10% de los hombres con edades comprendidas entre los 65 y 79 años ⁽¹⁰⁾.

Dentro de las potenciales complicaciones de los aneurisma de aorta (embolización distal del trombo mural, infección, trombosis aórtica con isquemia severa de miembros inferiores, ateroembolismo, trombosis venosa por compresión ilio-cava), la rotura del aneurisma constituye la complicación más grave dado el shock hipovolémico que ocasiona con importante riesgo de muerte. Aproximadamente se producen anualmente en Estados Unidos unas 15.000 muertes por aneurisma de aorta roto, siendo la 13ª causa de muerte en varones por encima de los 55 años^{(11), (12)}.

I.A.4. Clínica

La mayoría de los pacientes con un aneurisma de aorta abdominal (aproximadamente el 75%) se encuentran asintomáticos en el momento del diagnóstico. Es muy frecuente que el hallazgo del aneurisma se realice de forma casual durante el transcurso de una exploración física con palpación abdominal o en una prueba de imagen solicitada por otra causa. Ocasionalmente es el propio paciente quien siente un "pulso" en el abdomen o se palpa a sí mismo una masa pulsátil. Cuando producen síntomas, lo más frecuente es que se manifiesten como un dolor sordo y leve en epigastrio, que puede llegar a ser de fuerte intensidad en aneurismas con una rápida expansión. En otras ocasiones puede producir dolor lumbar, mejor localizado y más constante, como consecuencia de la erosión vertebral; esto se produce en casos de aneurismas aórticos de gran tamaño.

Rara vez los aneurismas de gran tamaño pueden provocar síntomas derivados de la compresión de estructuras adyacentes: saciedad precoz,

náuseas, vómitos (compresión digestiva a nivel del duodeno), síntomas urinarios por hidronefrosis (compresión ureteral), trombosis venosa (compresión ilio-cava).

En ocasiones parte del material trombótico presente en la pared de la aorta aneurismática puede embolizar distalmente, produciendo un cuadro de isquemia aguda en los miembros inferiores, y debe sospecharse en un paciente con isquemia aguda de miembros inferiores sin foco embolígeno cardíaco aparente. La isquemia puede llegar a ser muy severa en caso de trombosis del aneurisma, lo que ocurre en menos del 2-5% de los pacientes con aneurisma de aorta sintomático ⁽¹³⁾. En caso de ateroembolismo puede presentarse el denominado "Blue toe syndrome" que se produce cuando el material embólico ocluye las pequeñas arterias y arteriolas del pie, dando lugar a un cuadro isquémico más o menos severo, pero manteniendo la presencia de pulsos distales.

La complicación más temida de los aneurismas de aorta abdominal es su rotura. Entre el 30 y el 50% de los pacientes con un aneurisma roto mueren antes de poder llegar al hospital (14), 30-40% llegan al hospital pero fallecen antes de poder ser intervenidos (14), y de los pacientes que se operan la mortalidad se cifra entre el 30 y el 50% (15). Clínicamente la rotura se caracteriza por la clásica tríada de hipotensión, dolor abdominal o lumbar severo y masa pulsátil palpable en abdomen. Constituye una situación de emergencia vital que requiere una intervención quirúrgica urgente.

Formas especiales de manifestación clínica de un aneurisma de aorta son la fistulización a un asa intestinal, frecuentemente la tercera porción de

duodeno, constituyendo una fístula aorto-entérica primaria que ocasiona una hemorragia digestiva masiva con alto riesgo de mortalidad. También puede fistulizar hacia la vena cava (fístula aorto-cava) originando una sobrecarga del territorio venoso que puede desencadenar insuficiencia cardíaca.

I.A.5. Diagnóstico

Dado que la mayoría de los aneurismas de aorta abdominal son asintomáticos, la mayor parte de las veces el diagnóstico se realiza de forma casual mediante una prueba de imagen solicitada por otro motivo. Es posible sospechar la presencia de un aneurisma tras una detallada historia clínica (es más frecuente en varones mayores de 50 años, fumadores e hipertensos, especialmente si existen antecedentes familiares de patología aneurismática aórtica), y sobre todo, mediante la palpación de una masa pulsátil en mesogastrio. Sin embargo, la sensibilidad de la palpación abdominal depende del tamaño del aneurisma, de la obesidad del paciente y de la habilidad del explorador, variando del 29% en aneurismas entre 3 y 3.9 cm hasta el 75% en los aneurismas mayores de 5 cm ^{(16), (17)}.

Las técnicas de imagen que se utilizan para el diagnóstico son la ecografía abdominal, la tomografía axial computerizada (TAC) y la resonancia magnética nuclear (RMN).

La ecografía abdominal constituye el método de diagnóstico para AAA más barato, menos invasivo y más frecuentemente utilizado, sobre todo en la confirmación diagnóstica en caso de sospecha por palpación de una masa pulsátil y en el seguimiento de los aneurismas de pequeño tamaño. Como

principal inconveniente presenta una variabilidad inter-observador de aproximadamente 5 mm, y tiende a infraestimar el tamaño máximo del aneurisma entre 2 y 4 mm cuando se compara con la TAC⁽¹⁸⁾.

La TAC abdomino-pélvica con contraste se utiliza fundamentalmente como prueba de imagen de elección en la valoración preoperatoria de los AAA, dado que proporcionan medidas anatómicas más precisas, con una variabilidad inter-observador menor de 5 mm⁽¹⁸⁾ (Figura 1.1). Actualmente se utilizan TAC helicoidales que realizan tomografías con muy poca distancia entre cortes, permitiendo una medición muy precisa de las características anatómicas del aneurisma. Tiene especial utilidad en pacientes con obstrucción en las arterias ilíacas, y aporta importante información sobre el estado de las arterias viscerales. Gracias a esto y a la posibilidad de realizar reconstrucciones multiplanares y en 3D, la arteriografía ha sido relegada a un segundo plano en la valoración de pacientes con AAA. Su como principal inconveniente la radiación ionizante y la necesidad de contraste intravenoso con el consiguiente riesgo de nefropatía por contraste.

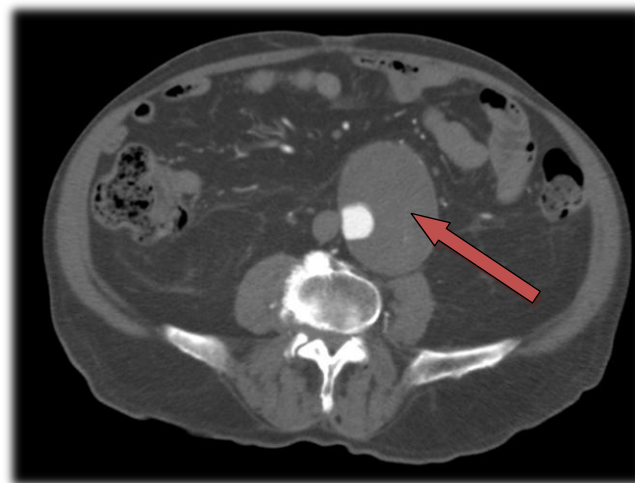


Figura 1.1: imagen de TAC en la que se visualiza un AAA. En ella puede apreciarse la presencia de una importante cantidad de trombo mural (Flecha roja)

La RMN proporciona una buena información anatómica, con diferenciación de las distintas partes blandas. La adición de contraste intravenoso (no yodados, en este caso contienen gadolinio) mejora la visualización del árbol arterial, permitiendo mediciones precisas y valoración anatómica preoperatoria de los AAA. Sin embargo, esta prueba no se encuentra disponible en todos los centros, está contraindicada en pacientes claustrofóbicos y, a pesar de que previamente se proponía como alternativa segura a la TAC con contraste en pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC), puede producir fibrosis sistémica nefrogénica secundaria a la administración de gadolinio en pacientes con función renal deteriorada ⁽¹⁹⁾.

La arteriografía no constituye una prueba de imagen válida para el diagnóstico, dado que es una prueba invasiva y que la presencia de trombo mural puede ocasionar falsos negativos en el diagnóstico (tan sólo se visualiza la luz arterial, por lo que la presencia de trombo mural puede enmascarar el diámetro máximo real de un aneurisma de aorta - Figura 1.2-). También se encuentra en desuso su utilización como prueba planificación preoperatoria del tratamiento de los AAA, dados los avances en la tomografía computarizada y la reconstrucción multiplanar que ésta permite ⁽²⁰⁾.



Figura 1.2: Arteriografía intraoperatoria durante el tratamiento endovascular del AAA del paciente de la figura 1. Nótese que no es apreciable el diámetro del aneurisma debido al trombo mural, y que incluso la aorta parece tener un calibre normal en la arteriografía.

I.A.6. Historia natural de los aneurismas de aorta abdominal.

De forma general podemos resumir la evolución natural de los aneurismas de aorta abdominal en crecimiento progresivo del mismo hasta que se produce finalmente su ruptura, si una enfermedad concomitante no produce el fallecimiento del paciente antes. Según una revisión de la bibliografía realizada por Hallin y colaboradores (15), la velocidad media de crecimiento de los aneurismas entre 3 y 3.9 cm es de 0.33 cm/año, de 0.41 cm/año cuando los aneurismas miden entre 4 y 5 cm, y de 0.51 cm/año si son mayores de 5 cm. Diferentes factores se han relacionado con una tasa mayor de crecimiento, como el tabaquismo activo, la hipertensión arterial y la cantidad de trombo mural del aneurisma ^{(21), (22), (23)}.

Durante las últimas 5 décadas el principal factor determinante del riesgo de rotura de los AAA ha sido el diámetro máximo del aneurisma. Según

una revisión de Brewster y colaboradores ⁽²⁴⁾, el riesgo de rotura de un aneurisma entre 4 y 5 cm de diámetro máximo se cifra ente 0.5 y 5% al año, subiendo hasta el 20% al año en los aneurismas entre 6 y 7 cm (Tabla 1.2). Otros factores, como la tasa de crecimiento, la forma del aneurisma y la historia familiar también influyen en el riesgo de rotura (una tasa de crecimiento rápida, los aneurismas saculares y los pacientes con historia familiar de AAA presentan un riesgo de rotura incrementado). Recientemente, el análisis de elementos finitos permite un estudio detallado de las características biomecánicas de los aneurismas de aorta, permitiendo una predicción no sólo del riesgo de rotura de un paciente con AAA, sino del segmento aórtico con mayor estrés parietal (y por tanto, de mayor riesgo de rotura) ⁽²⁵⁾. Este método de predicción ya ha sido validado en algunos centros. Sin embargo, en espera de que estudios multicéntricos lo validen, el diámetro máximo del aneurisma continuará siendo por el momento el principal determinante del riesgo de rotura y el factor más importante a la hora de sentar la indicación quirúrgica.

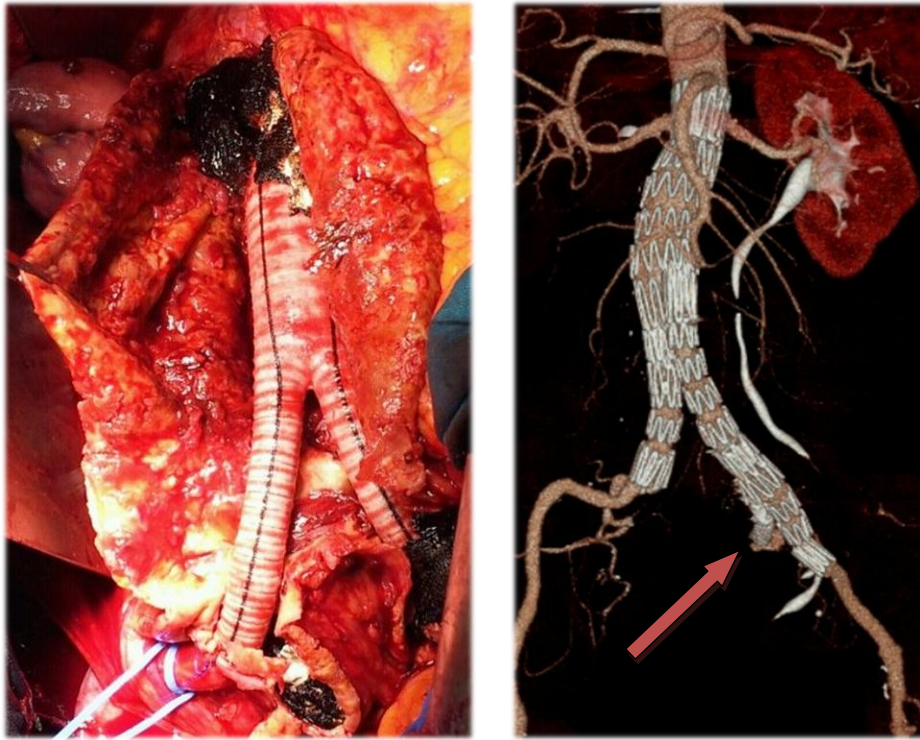
Diámetro máximo del AAA (cm)	Riesgo de rotura anual (%)
<4	0
4-5	0.5-5
5-6	3-15
6-7	10-20
7-8	20-40
>8	30-50

Tabla 1.2: Riesgo de rotura anual en relación con el diámetro máximo del AAA al año expresado en porcentaje, tomado de: Brewster DC et al. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. J Vasc Surg. 2003; 37(5): 1106-17.

I.A.7. Tratamiento

Desde que en 1991 Parodi describiese por primera vez el tratamiento endovascular de los aneurismas de aorta abdominal (26), las técnicas endovasculares han cambiado el panorama en el tratamiento de esta patología. Actualmente, según las últimas guías Europeas y Americanas^{(27), (28)}, se acepta que los aneurismas de aorta abdominal infrarrenal con un diámetro máximo superior a los 5.5 cm en su eje transversal, en determinados pacientes con un diámetro entre 5 y 5.5 cm (pacientes jóvenes, mujeres), así como los aneurismas sintomáticos, deben ser intervenidos si el riesgo quirúrgico y las enfermedades concomitantes del paciente lo permiten. Las opciones de tratamiento, en líneas generales, son 2:

1. Cirugía abierta convencional: consistente en endoaneurismorrafia, ligadura intrasacular del ostium de las arterias lumbares expuestas, e interposición de un injerto protésico entre el segmento proximal y distal a la extensión del aneurisma, ya sea recto o bifurcado (Figura 1.3)
2. Tratamiento endovascular (EVAR, *endovascular aortic aneurysm repair*): implantación de una endoprótesis desde un abordaje femoral bilateral, excluyendo de la circulación la pared aórtica enferma (Figura 1.4).



Figuras 1.3 y 1.4: A la izquierda, injerto bifurcado en el tratamiento quirúrgico de un AAA. A la derecha, reconstrucción 3D del Angio-TC de un paciente con un AAA tratado mediante una endoprótesis, con rama hipogástrica izquierda para preservar la circulación pélvica (flecha roja).

En pacientes jóvenes que no presenten importantes comorbilidades (sobre todo cardiopulmonares) está indicada la cirugía abierta convencional, dado que a pesar de su mayor morbilidad precoz, presenta menor tasa de complicaciones a largo plazo. En pacientes mayores de 70 años, con patología cardíaca o pulmonar severa, que presenten una anatomía aórtica favorable es preferible el tratamiento endovascular, dada su menor mortalidad perioperatoria. Como contrapunto, este tratamiento precisa de un seguimiento estricto con técnicas de imagen (la más habitual Angio-TC) dado su mayor riesgo de complicaciones a medio y largo plazo (normalmente endofugas) que requieran reintervenir al paciente. Sin embargo, dado el avance en el desarrollo tecnológico de los dispositivos y en las técnicas de implantación, en las últimas

guías se empieza a recomendar el tratamiento endovascular como técnica de primera elección, relegando el tratamiento quirúrgico abierto a los casos en los que no se pueda realizar el primero y en los que el paciente, una vez informado de los riesgos y beneficios de cada opción, prefiera la cirugía abierta (27),⁽²⁸⁾.

I.B. Patogenia de los AAA.

En el momento actual aún no se encuentra claramente definido cuál es el mecanismo por el que la aorta abdominal se dilata formando un aneurisma. Se pueden considerar tres teorías etiopatogénicas: la arterioesclerótica, la hemodinámica-mecánica y la inmunogenética.

I.B.1. Teoría arterioesclerótica.

Muchos de los pacientes con un AAA presentan algún grado de enfermedad arterioesclerótica en el territorio coronario, carotídeo y en miembros inferiores. Además, los pacientes con un AAA, presentan algunos de los factores de riesgo que habitualmente se encuentran asociados a la arterioesclerosis.

La arterioesclerosis es una patología que consiste en una compleja serie de eventos entre los que se encuentran la proliferación y migración celular, el depósito intimal de lípidos, la inflamación, la fibrosis y la necrosis que va a dar lugar como colofón a la formación de la placa arterioesclerótica. Cuando esta se forma, las arterias tienden a compensar la disminución en la luz arterial con una remodelación que lleva al crecimiento de la misma para intentar mantener su diámetro ante el crecimiento de la placa. Este hecho ha sido demostrado en las arterias coronarias, carotídeas, aorta abdominal y arterias femorales superficiales de humanos ^{(29), (30)}.

La secuencia de hechos que defienden aquellos que abogan por un origen arterioesclerótico de los AAA es la siguiente:

1. El depósito de la placa arterioesclerótica en la íntima de la aorta se acompaña de un crecimiento compensatorio de la arteria con un adelgazamiento y atrofia de la media que se encuentra debajo de la placa. Bajo estas circunstancias, la placa es la responsable del soporte estructural de la aorta.
2. Una atrofia posterior de la placa da lugar a mayor crecimiento de la aorta ya que su pared, al tener la media atrófica y adelgazada, es incapaz de soportar la tensión. Se produce por tanto un aumento progresivo del aneurisma por fuerzas mecánicas.
3. Además, el proceso de regresión de la placa puede dar lugar a una liberación de enzimas proteolíticas que ayuden en este proceso.

I.B.2. Teoría mecánica.

La aorta abdominal presenta una serie de características particulares que pueden hacerla susceptible a la aparición de AAA desde un punto de vista mecánico. Existen una serie de diferencias entre la aorta abdominal y torácica de la especie humana no presentes en otras especies de mamíferos, que apoyan esta aseveración.

Por una parte, la aorta abdominal presenta una cantidad mucho menor de vasa vasorum en su pared, lo que da lugar a un déficit de nutrientes respecto a la aorta torácica. Al mismo tiempo, la pared de la aorta torácica presenta un número de lamelas que soportan una tensión local de 2000 dynas/cm, que es lo habitual entre otras especies de mamíferos. Sin embargo,

en la aorta abdominal el número de lamelas está muy disminuido y esto hace que deban soportar una tensión local de 3000 dynas/cm, es decir, un 50% más que en la aorta torácica ⁽³¹⁾.

La unión de este factor puramente "físico" a la disminución de nutrientes con los subsecuentes cambios metabólicos en la pared, puede dar lugar a la aparición de una debilidad local que predisponga al desarrollo de aneurismas en esta localización.

I.B.3. Teoría inmunogenética

I.B.3.1. Introducción.

Frente al concepto clásico de que la arterioesclerosis es la causa fundamental de los AAA, a mediados de los 80 y durante la década de los 90 comenzaron a aparecer estudios que proponían mecanismos diferentes en la patogenia de los AAA. Estos estudios buscaban otra posible explicación diferente a la arterioesclerótica, en base a las diferencias que se encontraban entre la arterioesclerosis aórtica y los AAA y al tratar de dar una explicación al papel predominante que jugaban las metaloproteinasas en la patogenia de éstos.

I.B.3.2. Diferencias entre los AAA y la arteriosclerosis aórtica.

Aunque los aneurismas inespecíficos de aorta abdominal presentan evidencias de degeneración arterioesclerótica tanto desde el punto de vista

macroscópico como microscópico, el concepto clásico según el cual la arterioesclerosis es la causa fundamental de estos aneurismas se encuentra hoy en duda.

Una posible explicación para los hallazgos de arterioesclerosis en los aneurismas de aorta abdominal infrarrenal es que, a medida que el vaso se dilata, se producen alteraciones del flujo laminar en la superficie interna del aneurisma, lo que condicionaría la proliferación subintimal. Esto daría lugar a la formación de la placa arterioesclerótica, de la misma manera que ocurre en las bifurcaciones arteriales, que es el lugar donde más frecuentemente asientan las lesiones arterioescleróticas⁽³²⁾.

La asociación de estos aneurismas con los factores de riesgo habitual en los pacientes con arterioesclerosis también pueden ser explicados mediante algunas teorías:

- a) La hipertensión puede tener un efecto directo sobre la dilatación de un vaso que se encuentra predispuesto por su debilidad, de forma independiente al efecto de proliferación subintimal que es típico de la degeneración arterioesclerótica^{(33), (34)}.
- b) El tabaco puede tener un efecto independiente mediante la inhibición de determinados factores antiproteolíticos que protegen la matriz como la α 1- antitripsina⁽³³⁾.
- c) Aunque los niveles de colesterol se encuentran elevados en los pacientes con aneurismas inespecíficos de aorta abdominal, siendo un factor de riesgo cuando se analizan series de pacientes largas, el 60% de los pacientes presentan niveles

inferiores a 240 mg/dl y el 40% niveles inferiores a 215 mg/dl, niveles medios muy inferiores a los obtenidos en los pacientes que presentan arterioesclerosis⁽³³⁾.

Por tanto estos hechos pueden explicarse con la teoría de que algunos factores de riesgo (sobre todo la hipertensión y el tabaquismo) actúan produciendo lesiones arterioescleróticas en unos pacientes y degeneración aneurismática en otros. Además, hay otros puntos que apoyan la aseveración de que los aneurismas no son arterioescleróticos en origen:

- a) En comparación con los pacientes que presentan enfermedad oclusiva del sector aortoiliaco, los pacientes con aneurismas de aorta abdominal presentan una edad media superior, afectan con mayor frecuencia a hombres y presentan menos enfermedad oclusiva periférica⁽³⁵⁾.
- b) Los pacientes con aneurismas de aorta abdominal se encuentran asociados a determinadas patologías independientes de la arterioesclerosis, como son su asociación más frecuente a las hernias inguinales y al enfisema, lo cual puede indicar la presencia de determinadas condiciones patológicas sistémicas independientes de la arterioesclerosis⁽³⁶⁾,
(37), (38).
- c) La presencia de aneurismas en otras localizaciones (ilíacos, femorales, poplíteos e intracraneales) se asocia con mayor frecuencia a pacientes con aneurisma de aorta abdominal que a pacientes con arteriosclerosis obliterante⁽³⁶⁾.

- d) Estudios poblacionales indican que la incidencia de aneurismas de aorta abdominal está aumentando, mientras que la incidencia de enfermedad arterioesclerosa del sector aortoiliaco está disminuyendo ^{(39), (40), (41)}.

Desde el punto de vista anatomopatológico, hay diferencias claras entre ambas enfermedades, que se hacen aún más patentes cuando se realizan estudios inmunohistoquímicos. El primer estudio que puso de manifiesto estas diferencias fue realizado por Koch y colaboradores en 1990 ⁽⁴²⁾. En él se mostró cómo las características anatomopatológicas de ambas enfermedades eran muy diferentes al analizar en profundidad las subpoblaciones de células inflamatorias que se encontraban presentes en cada caso. Las diferencias quedan esquematizadas en los siguientes puntos:

- Desde el punto de vista microscópico, la arterioesclerosis aórtica se caracteriza por la presencia de placas arterioescleróticas que se localizan en la íntima, con una media que se encuentra afectada por una reacción inflamatoria y con escasa o nula afectación de la adventicia. En los aneurismas de aorta abdominal se puede observar cómo la íntima está pobremente conservada y muy atrófica, la media se encuentra conservada aunque atrófica, existiendo una gran afectación de la adventicia, donde reside una intensa reacción inflamatoria. Existe asimismo una disminución marcada de células musculares lisas (CML) en la capa media.
- Cuando se analiza la reacción inflamatoria existente en ambos tipos de afectación aórtica, puede observarse cómo en los

especímenes de arterioesclerosis aórtica el infiltrado inflamatorio es mucho menor que en los casos de AAA, y que además se localiza fundamentalmente en la media, frente a la adventicia en los AAA. Además, al estudiar las subpoblaciones de linfocitos, se observa cómo en la arterioesclerosis aórtica predominan la presencia de linfocitos T con un índice CD-4+/CD-8+ de 4:1, práctica ausencia de linfocitos B, que además se localizan en la adventicia, y presencia de macrófagos en mucha menor cuantía que en los AAA y que se ubican principalmente en la placa arterioesclerótica. En los especímenes de aneurisma de aorta abdominal se encuentra un infiltrado inflamatorio mucho más intenso y que se localiza en la adventicia como ha sido anteriormente expuesto. Los linfocitos T representan un porcentaje menor del infiltrado inflamatorio en comparación con la arterioesclerosis y además presentan un índice CD-4+/CD-8+ de 7:1 (mayor cantidad de linfocitos T-helper proporcionalmente respecto a aorta arterioesclerótica). Los linfocitos B tienen una presencia importante, constituyendo el 25-30% del infiltrado inflamatorio, y los macrófagos se encuentran distribuidos de forma similar entre media y adventicia pero en cantidad superior a la arterioesclerosis aórtica.

Todas estas diferencias pueden observarse en el siguiente esquema

(43) (Figura 1.5).

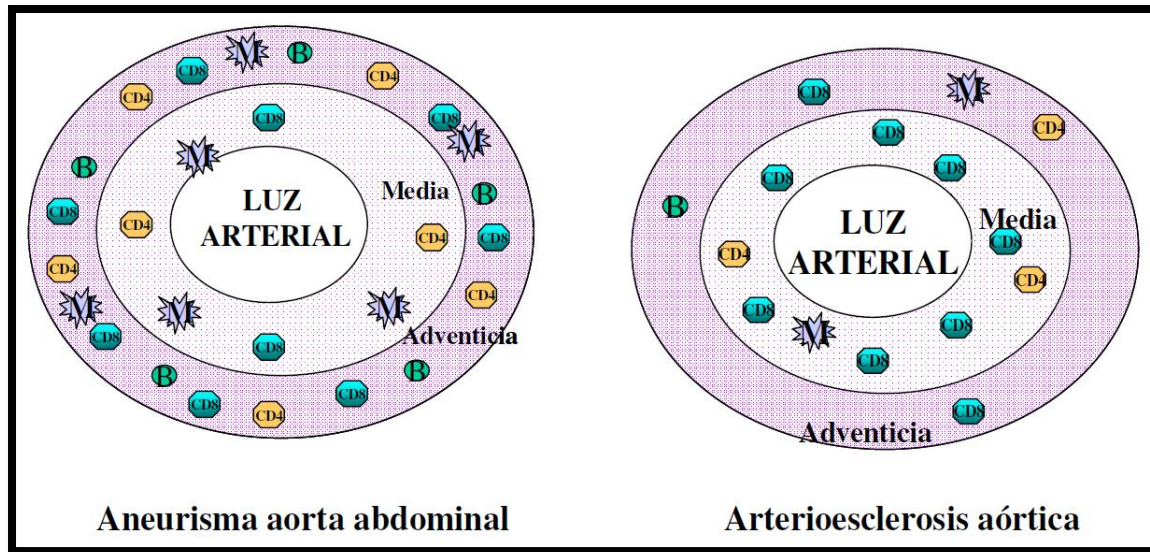


Figura 1.5: Diferencias en las poblaciones y localización de las células inmunes en la pared de la aorta afectada por arterioesclerosis y por AAA. Tomado de: Moñux Ducájú G. Papel de la autoinmunidad en la génesis de los aneurismas de aorta abdominal. Estudio inmunogenético [tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2003.

I.B.3.3. Papel de las metaloproteinasas.

Las metaloproteinasas, son un grupo de enzimas que juegan un papel muy importante en los procesos de remodelación de los componentes de la matriz extracelular. Estudios realizados durante la última década, han demostrado su importancia en la formación de los aneurismas de aorta abdominal, actuando en la pared de los mismos alterando los patrones normales de colágeno y elastina y produciendo por tanto la debilidad de la pared. En el momento actual se consideran que tienen una importancia clave las siguientes metaloproteinasas:

- MMP-1 (Colagenasa intersticial): Produce degradación del colágeno. Se produce en las células mesenquimales ante el estímulo de determinadas citoquinas ⁽⁴⁴⁾.
- MMP-2 (Gelatinasa A): Es una proteína de 72 Kd. Produce degradación de la elastina. Se localiza sobre todo en la media y en la adventicia, donde existen placas de ateroma. Se ha encontrado en las muestras de pacientes portadores de un AAA, sobre todo de pequeño tamaño ⁽⁴⁵⁾, pero no en aortas normales ni afectadas por enfermedad oclusiva ^{(46), (47), (48)}.
- MMP-3 (Estreptomelisina): Se produce en los macrófagos de la media y sobre todo de la adventicia. Se piensa que juega un papel importante en la degradación de la elastina y que además podría intervenir en la activación de la MMP-1 ⁽⁴⁹⁾.
- MMP-9 (Gelatinasa B): Es una proteína de 92 Kd. Produce degradación de la elastina. Se produce principalmente en los macrófagos de la adventicia y se piensa que es la principal de las MMP's en la patogenia de los AAA. Al igual que la gelatinasa-A, se ha encontrado en muestras de aneurismas de aorta abdominal pero nunca en muestras de aortas normales ni aortas afectadas por enfermedad oclusiva ^{(45), (47), (49), (50)}.
- MMP-12 (Elastasa macrofágica). Implicada en la degradación de la elastina. Se produce en los macrófagos localizados en la media y en la adventicia. Se caracteriza por localizarse en el tejido aórtico únicamente en presencia de aneurisma (al igual que ocurre con las dos gelatinasas) ⁽⁴⁷⁾.

I.B.3.4. Teoría actual sobre la patogenia de los AAA.

Junto al importante papel que juegan las metaloproteinasas en el desarrollo de los aneurismas de aorta abdominal y el infiltrado inflamatorio presente en la pared de estos aneurismas, existe otro punto importante que es el nexo de unión entre estos dos hechos. La presencia de un nivel aumentado de determinadas citocinas como la IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF) pueden influir en la producción alterada de metaloproteinasas que lleven a la destrucción de los componentes de la pared aórtica ^{(51), (52)}. Existen además hallazgos recientes en los que se pone de manifiesto que la respuesta inmune celular también puede formar parte en la modulación de la patogénesis de los AAA. Como ya se ha comentado, los linfocitos CD4+ (helper) son prevalentes en los AAA, y las citocinas tipo Th-1 o pro-inflamatorias (IL-1 y TNF- α), que aumentan la expresión en macrófagos de proteinasas que degradan la matriz, se encuentran en mayor cantidad en los aneurismas de aorta abdominal ^{(51), (52)}. Sin embargo, también se ha observado que las citocinas Th-2 o anti-inflamatorias (IL-4, IL-5, IL-10) también están aumentadas, sugiriendo que existen mecanismos reguladores celulares endógenos capaces de suprimir la destrucción celular ⁽⁵³⁾. Otros trabajos realizados en modelos animales indican que en la fase temprana de la formación del aneurisma existiría una respuesta inflamatoria tipo Th-1; sin embargo, en fases posteriores se produce un incremento en la producción de citocinas Th-2 que actuarían suprimiendo la inflamación ⁽⁵⁴⁾.

En pacientes con AAA, el modo y amplitud de esta respuesta inmune celular podría jugar un papel importante en la variabilidad observada tanto en la velocidad como en la extensión de la progresión del aneurisma, tanto entre distintos individuos como dentro de un mismo individuo en distintos momentos.

Por tanto, con todo lo anterior, se podría realizar un esquema (figura 1.6) que intentara resumir el proceso de aparición de los aneurismas de aorta abdominal:

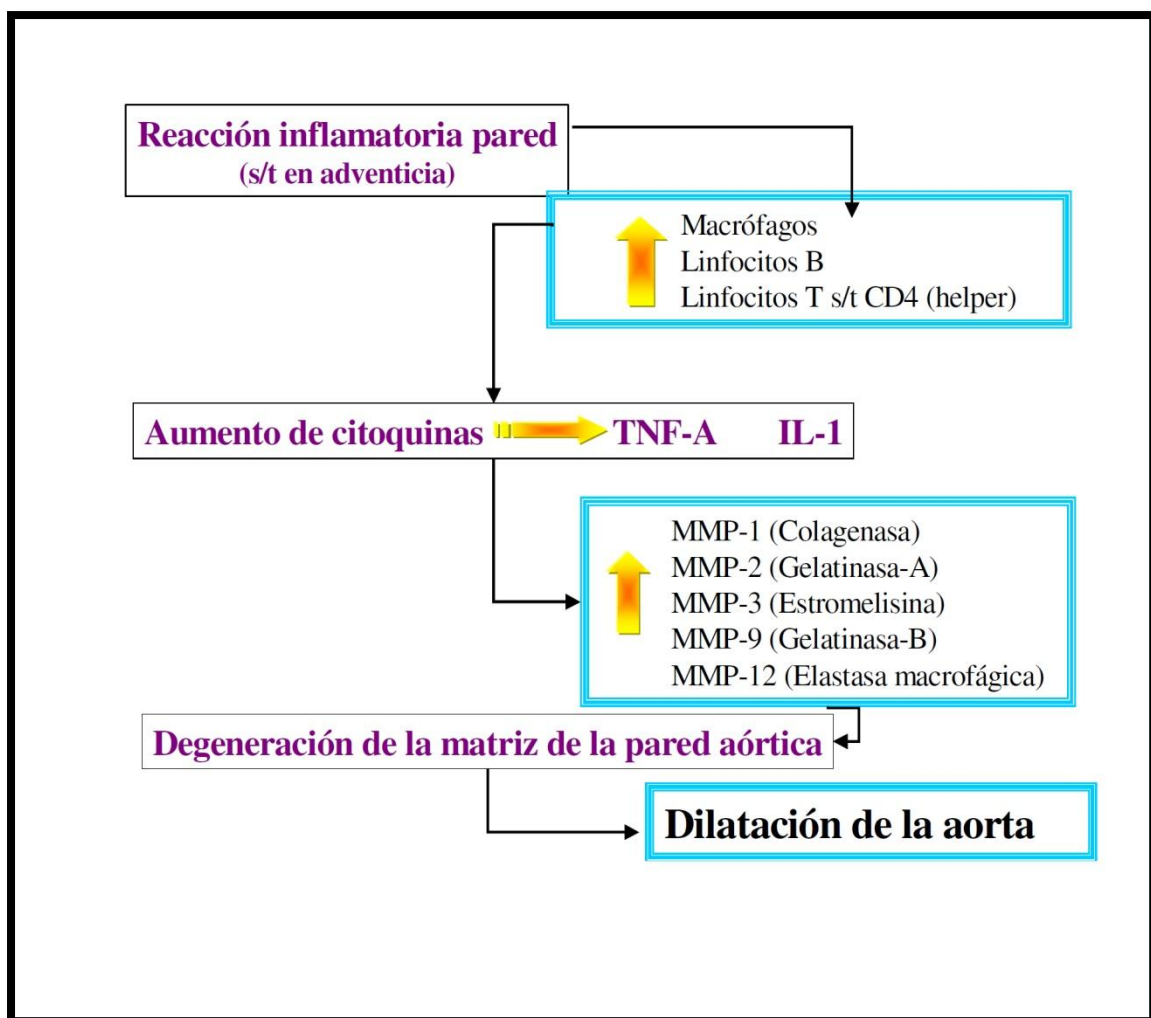


Figura 1.6: Esquema de la patogenia de los AAA

El porqué se produce esta reacción inflamatoria que va a desencadenar el proceso es todavía una incógnita a resolver. Entre las opciones que se deben tener en cuenta se encuentra la de una susceptibilidad genética, que puede ponerse de manifiesto en forma de una enfermedad autoinmune.

I.C. Estructura de la pared aórtica.

I.C.1. Anatomía de la pared arterial.

La pared arterial presenta una composición y una organización estructural común en todo el sistema vascular, aunque la proporción de los componentes puede fluctuar en las diferentes regiones del árbol vascular. En líneas generales está compuesta fundamentalmente por tejido conectivo, compuesto de células y matriz extracelular organizadas en tres capas: íntima, media y adventicia ⁽¹⁾.

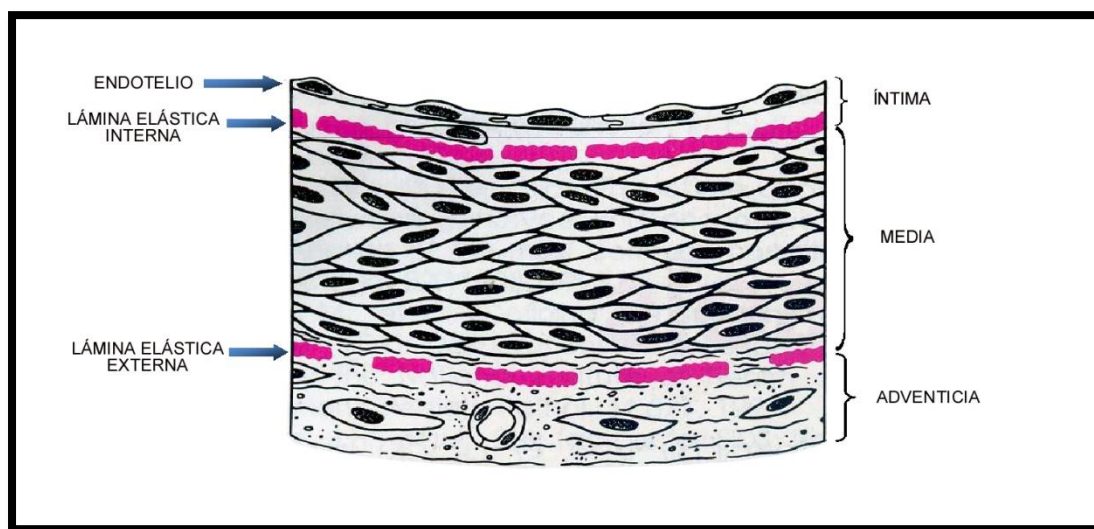


Figura 1.7: Esquema de las tres capas que componen la pared arterial

- Capa íntima: constituye la capa más interna de la pared arterial, y comprende desde la luz del vaso hasta la lámina elástica interna. Está compuesto, de dentro a fuera:
 - Endotelio: consiste en una capa continua de células epiteliales planas en contacto directo con el flujo sanguíneo. No solamente constituye una barrera física en el vaso, sino que participa en procesos fisiológicos y patológicos, reacciona a fuerzas físicas, señalización química, mediadores inmunológicos y es un importante regulador del tono vasomotor.
 - Lámina basal: fina capa de matriz extracelular, que proporciona sostén y ayuda a la regeneración de la capa endotelial. Conecta el endotelio con el tejido conjuntivo subyacente y células musculares lisas. También interviene en la permeabilidad de los vasos, los procesos de coagulación y la migración celular. Se pueden objetivar dos zonas dentro de esta lámina basal: la lamina lúcida y la lámina densa. La primera es rica en la glicoproteína laminina, mientras que la segunda está compuesta fundamentalmente en colágeno tipo IV. La lámina basal está compuesta en su conjunto por glicoproteínas, moléculas de adhesión como laminina, fibronectina, entactina, trombospondina, proteoglicanos como el heparán sulfato y colágeno tipo IV y V.

- Lámina elástica interna: es una capa de fibras elásticas de aproximadamente unos 70-100 nm de espesor. Estudios experimentales sugieren que tanto las células endoteliales como células musculares lisas del tejido intersticial son responsables de la producción de elastina en la lámina elástica interna ⁽⁵⁵⁾. La elastina se organiza en laminillas cilíndricas con fenestraciones que permiten el paso de macromoléculas. En las grandes arterias, como la aorta, existen indicios que sugieren que tanto la lámina elástica interna como el resto de laminillas de elastina actúan como barrera frente a la acumulación de macromoléculas en la pared arterial. De hecho, defectos estructurales en la lámina elástica interna están implicados directamente en el engrosamiento de la íntima en arterias humanas (56).
- Capa media: se extiende desde la lámina elástica interna hasta la adventicia. Se trata de una capa porosa y heterogénea, consistente en una matriz extracelular con fibras de colágeno y elastina donde se encuentran alojadas células musculares lisas, las cuales se encuentran dispuestas en grupos de células con una orientación similar. A presiones bajas y fisiológicas, la capa media es la determinante de las propiedades de la pared arterial. Su composición y microarquitectura están diseñadas para asegurar la estabilidad arterial. La elasticidad de esta capa es responsable de la distensibilidad y los efectos capacitivos de la

pared arterial. Las arterias se clasifican, según la proporción entre células y componentes fibrosos, en arterias elásticas y arterias musculares.

- En las arterias elásticas se pueden encontrar laminillas concéntricas de elastina y haces de colágeno bien definidos en el espesor de la capa media, mientras que las fibras de tejido conectivo son menos frecuentes. Entre estas laminillas de elastina se disponen las células musculares lisas, conformando unidades laminares. Son arterias elásticas aquellas con mayor diámetro y las que se encuentran cerca del corazón (aorta, tronco braquiocefálico, ilíacas). Aunque el número de unidades laminares depende del diámetro del vaso, en el ser humano hay aproximadamente entre 40 y 60 de estas unidades en la aorta. El número de unidades disminuye progresivamente desde el corazón hasta las arterias periféricas.
- Las arterias musculares son habitualmente las ramas de segundo y tercer orden de las arterias elásticas. La capa media está compuesta fundamentalmente por células de músculo liso, con menor presencia de fibras de tejido conectivo.

La lámina elástica externa, de estructura similar a la interna pero menos desarrollada, separa la capa media de la adventicia. En las arterias elásticas suele ser más difícil

diferenciar estas láminas, dada la gran presencia de laminillas de elastina en la capa media.

- Adventicia: se extiende desde la lámina elástica externa hasta un límite difícil de definir, habitualmente contiguo con el tejido conectivo perivascular. Mientras que en la aorta existe un mínimo tejido fibroso adventicial, las grandes arterias musculares poseen una prominente capa adventicial compuesta de fibras elásticas y colágeno. En ocasiones, la adventicia puede ser más prominente que la propia capa media. La composición celular en la adventicia es escasa, y consiste principalmente en fibroblastos. En la adventicia se encuentran alojados los vasa vasorum y los vasa nervorum, que proporcionan nutrición a la media y a la adventicia, y contribuyen a la regulación de la función de las células musculares lisas. Las fibras nerviosas inducen vasoconstricción vía receptores adrenérgicos, y vasodilatación mediante la activación de receptores β . El estímulo nervioso se transmite desde el nervio hasta las células musculares más periféricas, y de éstas a las adyacentes mediante acoplamiento eléctrico. La nutrición de la íntima y de la porción más interna de la capa media se obtiene directamente del flujo sanguíneo de la luz arterial.

I.C.2. Proteínas estructurales de la pared arterial.

Una de las mayores funciones de las células de músculo liso en la capa media de la pared arterial consiste en la síntesis y depósito de las proteínas que componen la matriz extracelular. Al contrario de lo que ocurre en las arterias musculares y vasos de resistencia, las células musculares lisas contribuyen poco a las propiedades mecánicas pasivas de la pared de las arterias elásticas, por lo que en su mayor parte éstas dependen de un fenotipo concreto de matriz extracelular. Para ello, los componentes de la matriz extracelular se expresan de una forma secuencial y ordenada, de forma que la pared arterial ya formada presente las siguientes características (57):

- Una alta resistencia en la pared, donde una gran parte de la energía absorbida durante el inflado sistólico se recupera por la retracción elástica durante la diástole.
- Una baja histéresis (energía perdida durante el ciclo inflado-desinflado sisto-diastólico).
- Elasticidad no lineal caracterizada por aumento de la rigidez con el incremento de presión para proteger la pared arterial de la rotura.

Una vez comentada en el apartado anterior la estructura histológica de la pared arterial, y dado que el objetivo principal de esta tesis se centrará en el estudio proteómico de la aorta sana y aneurismática, a continuación se detallarán las principales proteínas estructurales que componen la matriz extracelular de la pared arterial, así como las proteínas estructurales intracelulares más importantes.

I.C.2.1. Colágeno.

Las proteínas que forman la familia del colágeno constituyen las proteínas más abundantes del tejido conectivo, y pueden encontrarse en el tejido intersticial de prácticamente todos los órganos parenquimatosos, donde contribuyen a la estabilidad de los tejidos y mantienen su integridad estructural.

Con el término colágeno se engloba a una familia de proteínas que forman parte de la matriz extracelular del tejido conectivo. Está sintetizada fundamentalmente por los fibroblastos, aunque también pueden producirla otras estirpes celulares. Se encuentra en diferentes tejidos (piel, tendones, hueso, vasos sanguíneos, cartílago, etc.) y en cada uno de ellos tiene una estructura característica de acorde a la función que desempeña en ellos ⁽⁵⁸⁾.

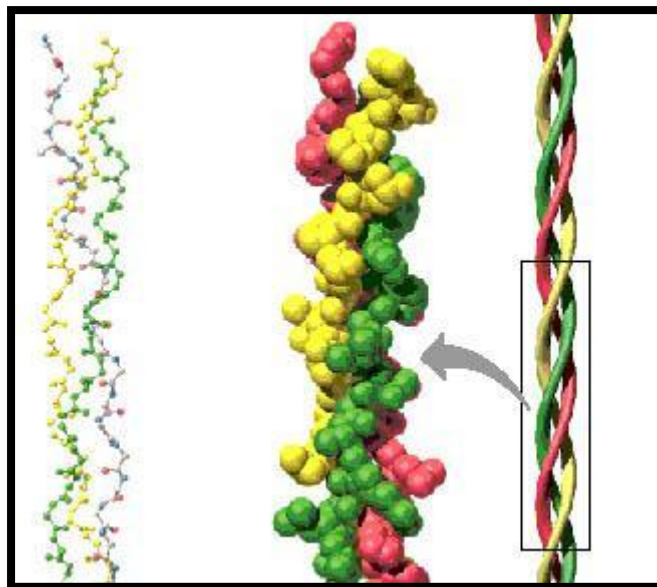


Figura 1.8: Estructura molecular del colágeno

La unidad fundamental del colágeno es el tropocolágeno, molécula formada por tres cadenas polipeptídicas de igual tamaño (cadenas α). Cada cadena es una hélice levógira, y las tres cadenas se enrollan para formar una

superhélice dextrógira. Para que las tres cadenas puedan enrollarse en esa triple hélice, éstas deben tener el aminoácido más pequeño (glicina - Gly) localizado en la cadena cada tercer residuo. Es decir, cada una de las cadenas poseen una estructura repetitiva de Gly-Xaa-Yaa, en la que Xaa e Yaa pueden ser cualquier aminoácido, aunque frecuentemente son los aminoácidos prolina e hidroxiprolina (59).

Se han encontrado más de 20 clases de colágeno genéticamente distintos en tejidos animales. En base a su estructura y organización supramolecular, pueden ser agrupados en colágenos formadores de fibrillas, colágenos asociados a fibrillas (FACIT, *Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple-helices*), colágenos formadores de redes, fibrillas de anclaje, colágenos transmembrana, colágenos de membrana basal y otras clases de colágenos con funciones únicas (60) (Tabla 1.3).

Tipo	Composición molecular	Genes (localización genómica)	Distribución tisular
Colágenos formadores de fibras			
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	COL1A1 (17q21.31–q22) COL1A2 (7q22.1)	Hueso, dermis, tendones, ligamentos, córnea
II	$[\alpha 1(II)]_3$	COL2A1 (12q13.11 – q13.2)	Cartilago, cuerpo vítreo, núcleo pulposo
III	$[\alpha 1(III)]_3$	COL3A1 (2q31)	Piel, pared vascular, fibras reticulares de la mayoría de tejidos (pulmones, hígado, bazo, etc.)
V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$	COL5A1 (9q34.2– q34.3) COL5A2 (2q31)	Pulmones, córnea, hueso, membranas

		COL5A3 (19p13.2)	fetales; siempre junto a colágeno tipo I
XI	$\alpha 1(\text{XI}) \alpha 2(\text{XI}) \alpha 3(\text{XI})$	COL11A1 (1p21) COL11A2 (6p21.3) COL11A3 = COL2A1	Cartílago, cuerpo vítreo
Colágenos de membrana basal			
IV	$[\alpha 1(\text{IV})]_2 \alpha 2(\text{IV}); \alpha 1-\alpha 6$	COL4A1 (13q34) COL4A2 (13q34) COL4A3 (2q36– q37) COL4A4 (2q36– q37) COL4A5 (Xq22.3) COL4A6 (Xp22.3)	Membranas basales
Colágenos microfibrilares			
VI	$\alpha 1(\text{VI}), \alpha 2(\text{VI}), \alpha 3(\text{VI})$	COL6A1 (21q22.3) COL6A2 (21q22.3) COL6A3 (2q37)	Muy extendido: dermis, cartílago, placenta, pulmones, pared vascular, discos intervertebrales
Fibras de anclaje			
VII	$[\alpha 1(\text{VII})]_3$	COL7A1 (3p21.3)	Piel, uniones dermo-epidérmicas, mucosa oral, cérvix
Colágenos formadores de redes			
VIII	$[\alpha 1(\text{VIII})]_2 \alpha 2(\text{VIII})$	COL8A1 (3q12– q13.1) COL8A2 (1p34.3– p32.3)	Células endoteliales, membranas de Descemet
X	$[\alpha 3(\text{X})]_3$	COL10A1 (6q21– q22.3)	Cartílago hipertrófico
Colágenos FACIT			
IX	$\alpha 1(\text{IX}) \alpha 2(\text{IX}) \alpha 3(\text{IX})$	COL9A1 (6q13) COL9A2 (1p33– p32.2)	Cartílago, humor vítreo, córnea

XII	$[\alpha 1(\text{XII})]_3$	COL12A1 (6q12– q13)	Pericondrio, ligamentos, tendones
XIV	$[\alpha 1(\text{XIV})]_3$	COL9A1 (8q23)	Dermis, tendones, pared vascular, placenta, pulmones, hígado
XIX	$[\alpha 1(\text{XIX})]_3$	COL19A1 (6q12– q14)	Rabdomiosarcoma
XX	$[\alpha 1(\text{XX})]_3$		Epitelio corneal, piel embrionaria, cartílago esternal, tendones
XXI	$[\alpha 1(\text{XXI})]_3$	COL21A1 (6p12.3– 11.2)	Pared vascular
Colágenos transmembrana			
XIII	$[\alpha 1(\text{XIII})]_3$	COL13A1 (10q22)	Epidermis, folículo capilar, endomisio, intestino, condrocitos, pulmones, hígado
XVII	$[\alpha 1(\text{XVII})]_3$	COL17A1 (10q24.3)	Uniones dermo-epidérmicas
Multipexinas			
XV	$[\alpha 1(\text{XV})]_3$	COL15A1 (9q21– q22)	Fibroblastos, células de músculo liso, riñón, páncreas
XVI	$[\alpha 1(\text{XVI})]_3$	COL16A1 (1p34)	Fibroblastos, amnios, queratinocitos
XVIII	$[\alpha 1(\text{XVIII})]_3$	COL18A1 (21q22.3)	Pulmones, hígado

Tabla 1.3: Tipos de colágeno y su localización más frecuente. Fuente: Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens - structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev. 2003 Nov 28; 55(12): 1531-46.

- Colágenos tipo I, II, III, V y XI: los colágenos formadores de fibrillas: Estos colágenos se caracterizan por su capacidad para conformar agregados supramoleculares altamente organizados, con una estructura característica de fibras escalonadas. Al microscopio electrónico, las fibrillas presentan un patrón de bandas característico con una periodicidad de alrededor de 70 nm (el llamado período D) resultado de la disposición escalonada de los monómeros de colágeno (Figura 1.9).

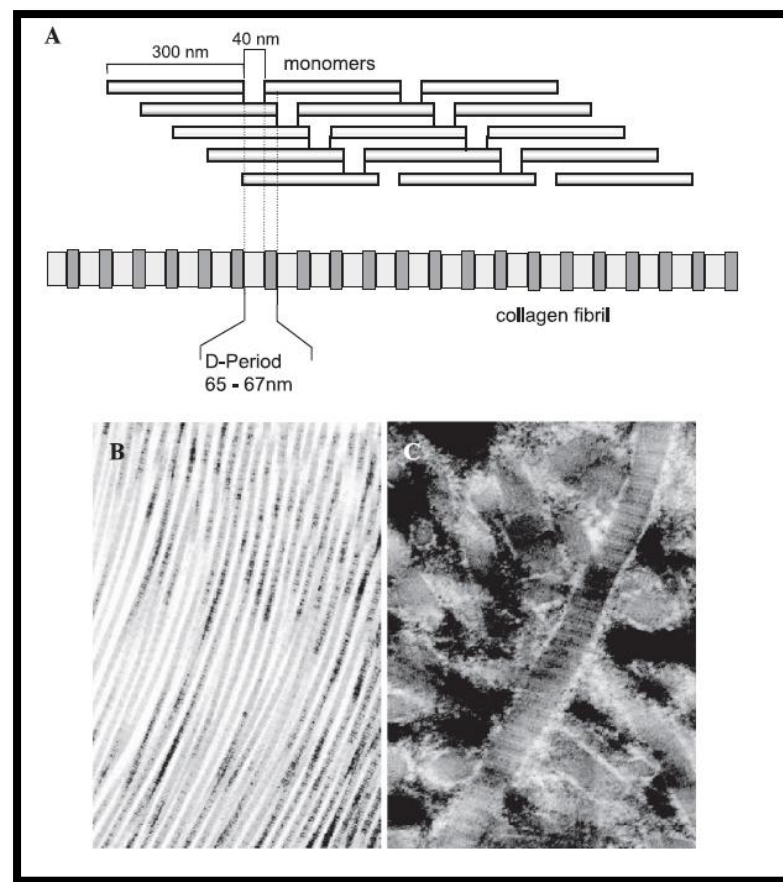


Figura 1.9: A; esquema del ensamblaje supramolecular en los colágenos formadores de fibrillas. B y C; micrografía electrónica donde se muestran fibras de colágeno tipo I en tendón (B) y de tipo II en cartílago articular (C). En ambos puede observarse el período D. Fuente: Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens - structure, function, and biosynthesis. Adv Drug Deliv Rev. 2003 Nov 28; 55(12): 1531-46.

El colágeno tipo I es el más abundante y el mejor estudiado de la familia de los colágenos. Forma parte de más del 90% de la masa orgánica en el hueso y es el colágeno principal de los tendones, piel, ligamentos, córnea y muchos de los tejidos conectivos (con la excepción del que se encuentra en el cartílago hialino, cerebro y cuerpo vítreo). Está formado por dos cadenas $\alpha 1(I)$ idénticas y una cadena $\alpha 2(I)$.

En muchos de los órganos donde se encuentra, y notablemente en los tendones y la fascia, el colágeno tipo I proporciona rigidez a la tensión. En el hueso es responsable de las propiedades biomecánicas relacionadas con la resistencia a la carga y la tensión.

El colágeno tipo II es el componente característico y predominante del cartílago hialino. También puede encontrarse en el cuerpo vítreo, el epitelio corneal, la notocorda, el núcleo pulposo de los discos intervertebrales y en las transiciones epitelio-mesenquimales del embrión. La triple hélice de este tipo de colágeno está formada por tres cadenas $\alpha 1(II)$, y es similar en tamaño y propiedades biomecánicas al colágeno tipo I. Comparado con éste, las moléculas de colágeno tipo II tienen un mayor contenido en hidroxilisina, así como residuos de glucosa y galactosa, los cuales median en la interacción con los proteoglicanos.

El colágeno tipo III es un homotrímero de tres cadenas $\alpha 1(III)$, y está ampliamente distribuido en los tejidos que contienen colágeno tipo I, a excepción del hueso. Es un componente importante de las fibras

reticulares en el tejido intersticial de los pulmones, hígado, dermis, bazo, y vasos sanguíneos. También es abundante en los tejidos elásticos junto con el colágeno tipo I.

Los tipos V y XI de colágeno están formados por tres cadenas α diferentes (α_1 , α_2 y α_3). La cadena α_3 del colágeno tipo XI está codificada por el mismo gen de la cadena α_1 del colágeno tipo II, diferenciándose solamente por la extensión de la glicosilación e hidroxilación. El colágeno tipo V forma heterofibrillas con el tipo I y III, y contribuye a formar la matriz orgánica del hueso, estroma corneal y la matriz intersticial de los músculos, hígado, pulmones y placenta. El tipo XI se distribuye ampliamente en el cartílago articular junto con el tipo II.

Debido a la dificultad para encontrar inmunológicamente a estos dos tipos de colágeno en los tejidos, se piensa que están localizados en el centro de las fibrillas en vez de en la superficie. Así, el colágeno tipo V podría funcionar como una estructura central, con fibrillas de colágenos tipo I y III polimerizando alrededor de este eje central. Análogo a este modelo, se piensa que el colágeno tipo XI forma el núcleo de las heterofibrillas de colágeno tipo II. Un alto contenido en tirosina-sulfato en los dominios N-terminal de las cadenas $\alpha_1(V)$ y $\alpha_2(V)$ proporciona una fuerte interacción con la triple hélice y estabiliza en complejo fibrilar (60)⁽⁶¹⁾.

- Colágenos tipo IX, XII y XIV - Los colágenos FACIT

Los colágenos tipo IX, XII, XIV, XVI, XIX y XX pertenecen al grupo de colágenos conocido como FACIT (*Fibril-Associated Collagens with*

Interrupted Triple-helices). La estructura básica de estos colágenos se compone de dominios colágenos interrumpidos por pequeños dominios no helicoidales, que actúan a modo de bisagras. Al contrario que la triple hélice, los dominios no colágenos están caracterizados por una mayor diversidad estructural y funcional entre los diferentes tipos de colágeno. Las interrupciones de la estructura helicoidal pueden ocasionar flexibilidad intramolecular y permitir una rotura proteolítica específica.

El colágeno tipo IX se codistribuye junto con el tipo II en el cartílago y el cuerpo vítreo. La molécula de este colágeno está compuesta por tres tipos distintos de cadenas α - $\alpha 1(\text{IX})$, $\alpha 2(\text{IX})$ y $\alpha 3(\text{IX})$ - formando tres dominios de triple hélice flanqueados por cuatro dominios globulares (NC1-NC4). Estas moléculas de colágeno se localizan periódicamente a lo largo de la superficie de las fibras de colágeno II, dispuestas de manera antiparalela. Una región bisagra en el dominio NC3 proporciona flexibilidad a la molécula y permite la interacción con los proteoglicanos o con otros componentes de la matriz extracelular. Asimismo, podría estar involucrada en la conexión de varias fibras de colágeno entre sí.

Los tipos de colágeno XII y XIV tienen una estructura similar y comparten secuencias homólogas al colágeno tipo IX. Ambas moléculas se asocian al colágeno tipo I en piel, pericondrio, periostio, tendones, pulmones, hígado, placenta y pared vascular. La función de estos colágenos, al igual que sucede con los tipos XIX y XX, es poco conocida.

- Colágeno tipo VI - Un colágeno microfibrilar

El colágeno tipo VI es un heterotrímero formado por tres cadenas α diferentes ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), con un pequeño dominio de triple hélice y una terminación globular. Una particularidad de este tipo de colágeno es que sus cadenas $\alpha 3$ son hasta el doble de largas respecto a las otras cadenas debido a sus dominios globulares en sus extremos N y C terminal. Estos dominios son objetivo de splicing alternativo y procesamiento post-transduccional. Las fibrillas primarias son ensambladas dentro de la célula como dímeros solapados de forma antiparalela, alineándose después paralelamente para formar tetrámeros. Tras ser secretados a la matriz extracelular, estos tetrámeros de colágeno VI se agregan en filamentos y forman una red microfibrilar independiente en prácticamente todos los tejidos conectivos, a excepción del hueso.

- Colágenos VIII y X - Colágenos de cadena corta.

Los colágenos tipos VIII y X son denominados colágenos de cadena corta. El tipo X es un componente característico del cartílago hipertrófico en la placa de crecimiento fetal y juvenil, así como en costillas y vértebras. Es un colágeno homotrimérico con un gran dominio C-terminal y un dominio N-terminal corto, cuyas fibras parecen asociarse formando redes hexagonales. La función del colágeno X no se conoce aún por completo, se cree que está implicado en la osificación endocondral y la calcificación de la matriz. De hecho, mutaciones en el gen COL10A1 son las causantes de la

condrodisplasia metafiseal tipo Schmid, en la que se encuentra impedida la osificación endocondral en la placa de crecimiento metafiseal, lo que provoca una deficiencia en el crecimiento y deformidades esqueléticas con miembros más cortos.

El colágeno tipo VIII es homólogo al X en estructura, pero muestra una distribución diferente y por lo tanto debe tener funciones distintas. Este colágeno se produce en las células endoteliales y se ensambla formando redes hexagonales, como en la membrana de Descemet en la córnea.

- Colágeno tipo IV - el colágeno de las membranas basales.

El colágeno tipo IV es el componente estructural más importante en las membranas basales. Su estructura se caracteriza por tres dominios: un dominio N-terminal 7S, un dominio C-terminal globular (NC1) y una triple hélice central con cortas interrupciones de las repeticiones de Gly-Xaa-Yaa, resultando en una triple hélice flexible.

Se han identificado hasta seis cadenas α , $\alpha 1(IV)$ - $\alpha 6(IV)$, que se asocian de tres formas diferentes para conseguir cadenas heterotriméricas, de las cuales la forma predominante es la representada por $\alpha 1(IV)_2\alpha 2(IV)$, formando la red esencial en la mayoría de las membranas basales del embrión y el adulto.

En la región amino terminal de la molécula (llamada 7S) existe otra región de triple hélice separada de la triple hélice principal por un rizo. En el extremo C-terminal de la molécula hay un gran dominio globular,

llamado NC1, que muestra una pequeña homología en su secuencia con el propéptido C de los colágenos fibrilares. Estos dominios permiten al colágeno tipo IV realizar interacciones intermoleculares para formar estructuras reticulares.

- Colágeno tipo VII - fibras de anclaje.

El colágeno tipo VII se encuentra muy próximo a las membranas basales, bajo el epitelio escamoso estratificado (por ejemplo, en la unión dermo-epidérmica de la piel) donde forma fibras de anclaje, que son estructuras simétricas de alrededor de 750 nm de longitud que unen la membrana basal a las placas de anclaje de la matriz extracelular. Este colágeno tiene la mayor región de triple hélice de los colágenos vertebrados, y una forma de autoasociación exclusiva. La molécula consiste en una región de triple hélice de aproximadamente 420 nm de longitud, con una pequeña región globular en un extremo (probablemente el extremo C-terminal), el cual parece ser eliminado proteolíticamente durante el ensamblaje intermolecular, y una gran estructura en forma de tridente en el otro extremo. Al igual que en el colágeno tipo IV, la región de triple hélice del colágeno tipo VII contiene varias interrupciones no helicoidales. Las moléculas se asocian para formar puentes dímeros antiparalelos estabilizados por puentes disulfuro y con un pequeño solapamiento en el extremo globular. Después, los dímeros se asocian para formar la estructura de anclaje

(62).

I.C.2.2. Elastina.

La elastina es la principal proteína encargada de otorgar la elasticidad a tejidos como el pulmón, la piel, y los vasos sanguíneos. Funciona como un polímero reticular y forma parte de las fibras elásticas, y su ensamblaje fuera de la célula requiere una asociación con numerosas proteínas extracelulares.

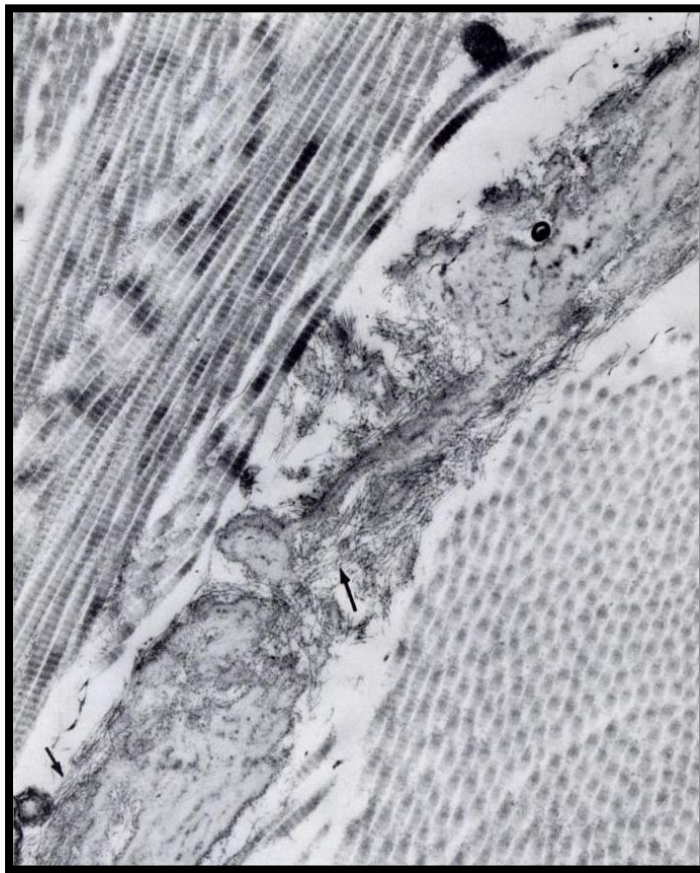


Figura 1.10: Micrografía electrónica que muestra una porción de fibra elástica extraída de la dermis de un varón adulto. Las fibrillas de colágeno con su características bandas pueden verse en la región superior izquierda de la micrografía. De forma diagonal, se observa una fibra elástica con sus dos componentes, las microfibrillas (flechas) rodeando el componente amorfo, la elastina. Fuente: Ross R. The elastic fiber. J Histochem Cytochem. 1973 Mar; 21(3): 199-208.

Es importante diferenciar entre elastina y fibra elástica, dado que en ocasiones estos términos se utilizan de forma intercambiable, y sin embargo se refieren a entidades separadas. Las fibras elásticas son estructuras complejas que contienen tanto elastina como microfibrillas; la elastina tiene una apariencia amorfa al observarla en el microscopio de transmisión electrónica, y es el

componente mayoritario de las fibras elásticas maduras. Las microfibrillas, en cambio, son filamentos de 10-15 nm de tamaño cuya función se piensa que consiste en facilitar el ensamblaje de la elastina y dar soporte estructural a la creciente fibra elástica (57),⁽⁶³⁾.

La aparición de la elastina en la evolución es bastante reciente, aparentemente coincidente con el desarrollo del sistema circulatorio cerrado, y se encuentra exclusivamente en vertebrados. En los humanos, al igual que en la mayoría de las especies, la elastina es codificada por un único gen. Este gen codifica una proteína de 60-70 kDa llamada tropoelastina, la cual posee un dominio común a todas las especies, caracterizado por secuencias hidrofóbicas que alternan con residuos de lisina que forman enlaces covalentes entrecruzados entre ellos y con otras moléculas de elastina. Este polímero entrecruzado es la forma funcional de la proteína. La enzima responsable de este entrecruzamiento es la lisina-oxidasa, la cual también realiza el entrecruzamiento de las moléculas de colágeno. La mayor diferencia entre el entrecruzamiento del colágeno y el de la elastina radica en el número global de entrecruzamientos; mientras que en el colágeno se encuentran entre 1 y 4 por unidad, la elastina contiene 15-20. Esta mayor cantidad de entrecruzamientos es importante para dar elasticidad a la molécula y contribuye a su longevidad. En 1991, Shapiro et al (64) calcularon que la longevidad de la elastina era la de una vida humana. Otros estudios han medido péptidos de elastina en sangre o entrecruzamientos de desmosina excretados en orina, y sugieren que menos del 1% de la cantidad total de elastina del organismo se recambia en 1 año (65).

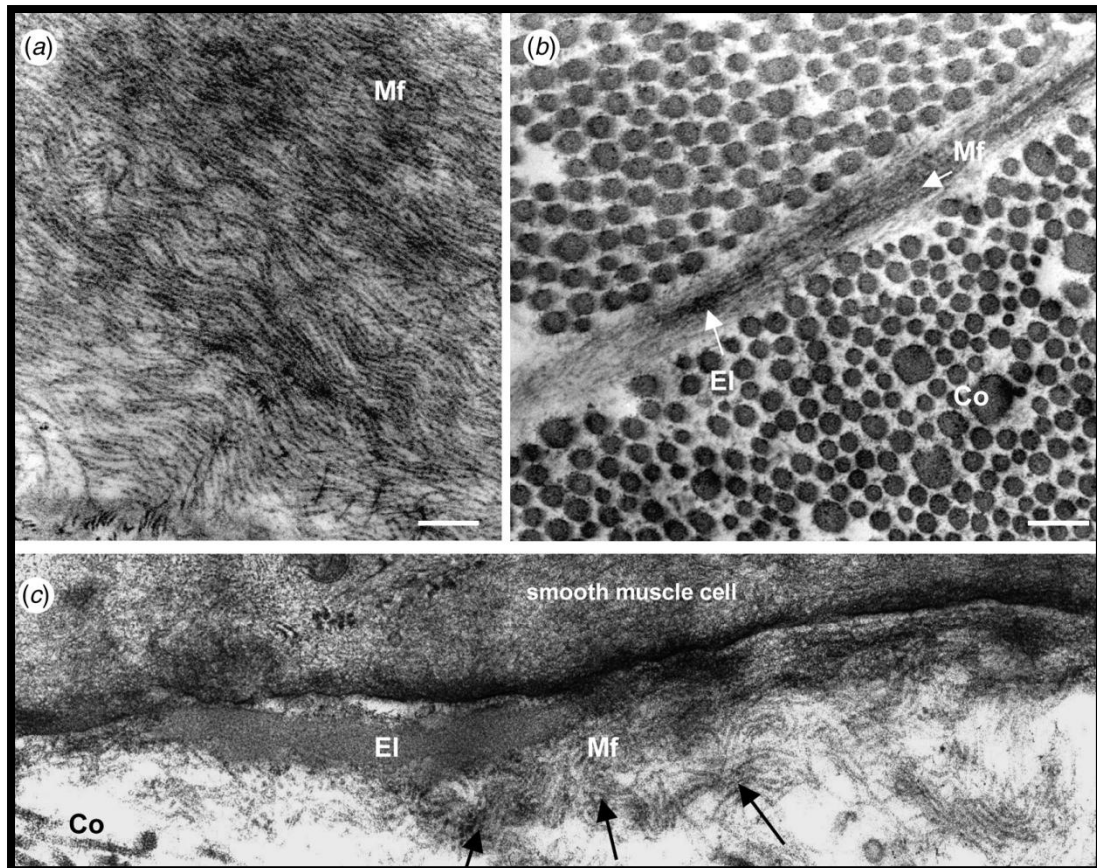
La expresión de la elastina en la mayoría de los tejidos ocurre en una estrecha ventana de tiempo, comenzando durante la gestación y sobre todo en el período postnatal. En la aorta, la expresión decae rápidamente cuando el aumento de presión arterial se estabiliza en el período postnatal, y la síntesis de elastina es mínima en el adulto.

La elastina es una de las primeras proteínas de la matriz estructural en ser expresadas por las células de músculo liso de los grandes vasos. La expresión de la elastina coincide con la condensación de células alrededor del tubo endotelial, se inicia en la parte externa de la capa media y se extiende hacia la luz. En los grandes vasos, la síntesis de elastina disminuye en sentidos opuestos: en la arteria pulmonar la expresión decae desde la adventicia hacia la luz, mientras que en los vasos sistémicos ocurre a la inversa.

I.C.2.3. Fibrilina y glicoproteínas asociadas a microfibrillas.

La fibrilina es una glicoproteína de 350 kDa que forma microfibrillas finas de 10 a 12 nm de diámetro. Los microfilamentos ricos en fibrilina se encuentran virtualmente en todos los tejidos conectivos dinámicos. En los tejidos elásticos, como la aorta, el pulmón, la piel y el cartílago elástico las microfibrillas de fibrilina se utilizan, durante las etapas iniciales de la elastogénesis, como sustrato para el armado de las fibras elásticas. Las microfibrillas se forman primero, y posteriormente la elastina se deposita sobre su superficie⁽⁶⁶⁾. Existen tres isoformas homólogas, la fibrilina-1 (codificada por un gen del cromosoma 15), la fibrilina-2 (codificada por un gen del cromosoma 5) y la recientemente descubierta fibrilina-3. La fibrilina-1 es el componente

mayoritario de las microfibrillas que forman parte de la fibra elástica, rodeando a la elastina amorfa. La fibrilina-2 parece participar en las fases tempranas de la elastogénesis, y la fibrilina-3 se localiza principalmente en el cerebro. Mutaciones en el gen de la fibrilina-1 se relacionan con el Síndrome de Marfan, mientras que mutaciones en el gen de la fibrilina-2 se asocian con la



aracnodactilia contractural congénita ⁽⁶⁷⁾. Por el momento no se conocen enfermedades relacionadas con mutaciones en el gen de la fibrilina-3 ⁽⁶⁸⁾.

Cada vez existe mayor evidencia de que las microfibrillas que contienen fibrilina no son simplemente polímeros de la misma, sino que una variedad de macromoléculas pueden estar asociadas a estas estructuras. Las funciones de estas moléculas podrían incluir ⁽⁶⁹⁾:

Figura 1.11: Microfibrillas ricas en fibrilina de vertebrados e invertebrados. (a) Microfibrillas de aorta de langosta en un corte longitudinal. (b) Sección de biopsia de piel de ratón. (c) Sección de aorta de ratón, mostrando una fibra elástica adyacente a una célula de músculo liso. En (b) y (c); Mf: manto microfibrilar; El: núcleo de elastina; Co: fibras de colágeno. Tomado de: Kielty CM, Baldock C, Lee D, Rock MJ, Ashworth JL, Shuttleworth CA. Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2002 Feb; 357(1418): 207-17.

- Soporte estructural al estabilizar la interacción de las moléculas de fibrilina en la microfibrilla.
- Mediación en la interacción con las microfibrillas adyacentes.
- Ensamblaje de la elastina en la superficie de las microfibrillas.
- Servir de interfase entre las microfibrillas y otros elementos estructurales de diferente naturaleza.
- Modulación en la interacción de las microfibrillas con las células para influir en el depósito, la orientación y la organización de las microfibrillas y las fibras elásticas.
- Provisión y modulación de las funciones no estructurales de las microfibrillas (por ejemplo, almacenamiento de TGF- β).
- Actividad enzimática (por ejemplo, lisil-oxidasas).
- Interacción específica con microfibrillas que contengan fibrilina-2.

De estas macromoléculas, las mejores caracterizadas son las Glicoproteínas Asociadas a Microfibrillas (MAGP). La MAGP-1 fue la primera en ser identificada en tejido bovino como un componente en los tejidos ricos en fibras elásticas, y específicamente se co-distribuye junto con las microfibrillas en los tejidos. Una proteína estructuralmente relacionada, la MAGP-2, fue posteriormente identificada en las microfibrillas, aunque con una distribución más restringida que la MAGP-1.

Además de las MAGP 1 y 2, otras proteínas han sido identificadas como potenciales componentes de las microfibrillas de fibrilina. A medida que se iban clonando los homólogos humanos de estas proteínas, se las fue

identificando con el nombre de proteínas asociadas a microfibrillas (MFAP); una de estas, la MFAP-2, es de hecho la MAGP-1⁽⁶⁹⁾.

- La MFAP-1 se ha encontrado en las microfibrillas de fibrilina de varios tejidos, entre los que se incluye la zónula ocular. Su gen se localiza cerca del locus de la fibrilina, en el cromosoma 15.
- La MFAP-2, también denominada MAGP-1, se codistribuye ampliamente con las microfibrillas de fibrilina, y se localiza periódicamente a lo largo de las mismas a modo de cuentas. Todo esto, junto con el hecho de que las MFAP-2 se encuentran covalentemente unidas por puentes disulfuro a las microfibrillas, sugiere que esta proteína sea un elemento estructural integral. Se ha sugerido que estas proteínas pueden estabilizar las regiones de unión cabeza-cola de las moléculas de fibrilina. También es posible que participe en interacciones laterales con otras microfibrillas.
- La MFAP-3 es una proteína rica en serina de 41 kDa, cuyo gen se encuentra en el cromosoma 5, y que se ha localizado en fibras de la zónula ocular, del ligamento nuchal en desarrollo y en la aorta y los pulmones fetales.
- La MFAP-4 es una proteína de 29 kDa, cuyo gen está en el cromosoma 17 y que fue hallada originalmente en la aorta porcina y bovina. Tiene una importante homología con una proteína de 36 kDa (MAGP-36), la cual se ha encontrado en las microfibrillas de fibrilina en aorta, piel y bazo. Comparte también parte de su secuencia con una proteína de 40 kDa encontrada

mediante IgG en la pared arterial de los aneurismas de aorta abdominal (de hecho, a esta proteína se la ha denominado también proteína asociada a los aneurismas - AAAP-40).

I.C.2.4. Actina.

La actina es la proteína más abundante en la mayoría de las células eucariotas. Su estructura está altamente conservada, y participa en más interacciones proteína-proteína que ninguna otra proteína conocida. Estas propiedades, y la capacidad de transición entre su forma monomérica (Actina G) y su forma filamentosa (Actina F) bajo diferentes estímulos, hacen de la actina un participante crítico en muchas funciones celulares, desde la motilidad celular, el mantenimiento de la forma y polaridad celular hasta la regulación de la transcripción. Asimismo, la interacción con otra proteína estructural, la miosina, conforma la base de la contracción muscular (70).

Todos los vertebrados expresan 3 isoformas principales de actina: α , β y γ . Dentro de la isoforma α , existen 3 isoformas distintas para el músculo esquelético, cardíaco y liso. Todas estas isoformas sólo difieren en unos pocos aminoácidos, y la mayor parte de las variaciones se encuentran en el extremo N-terminal. Se han documentado más de 80 estructuras diferentes de actina, observándose la mayoría formando complejos mediante unión con las denominadas proteínas de unión a la actina (ABP, del inglés *Actin-binding proteins*). Sin embargo, la conformación del monómero de actina es en todos los casos básicamente la misma. La actina pertenece a una superfamilia estructural junto con glucocinasas, hexocinasas y proteínas Hsp70. El

monómero de actina está formado por 375 aminoácidos y tiene unas dimensiones aproximadas de 67x40x37 Å y un peso molecular de 43 kDa. Está dividido en 2 dominios, los cuales se subdividen a su vez en 2 sub-dominios cada uno (llamados de 1 a 4, ó IA, IB, IIA y IIB). A cada monómero de actina se une una molécula de adenosín trifosfato (ATP) o de adenosín difosfato (ADP), localizados en la hendidura situada entre los dos dominios principales. De todas las combinaciones posibles, en la célula predominan la actina G-ATP y la actina F-ADP ⁽⁷¹⁾.

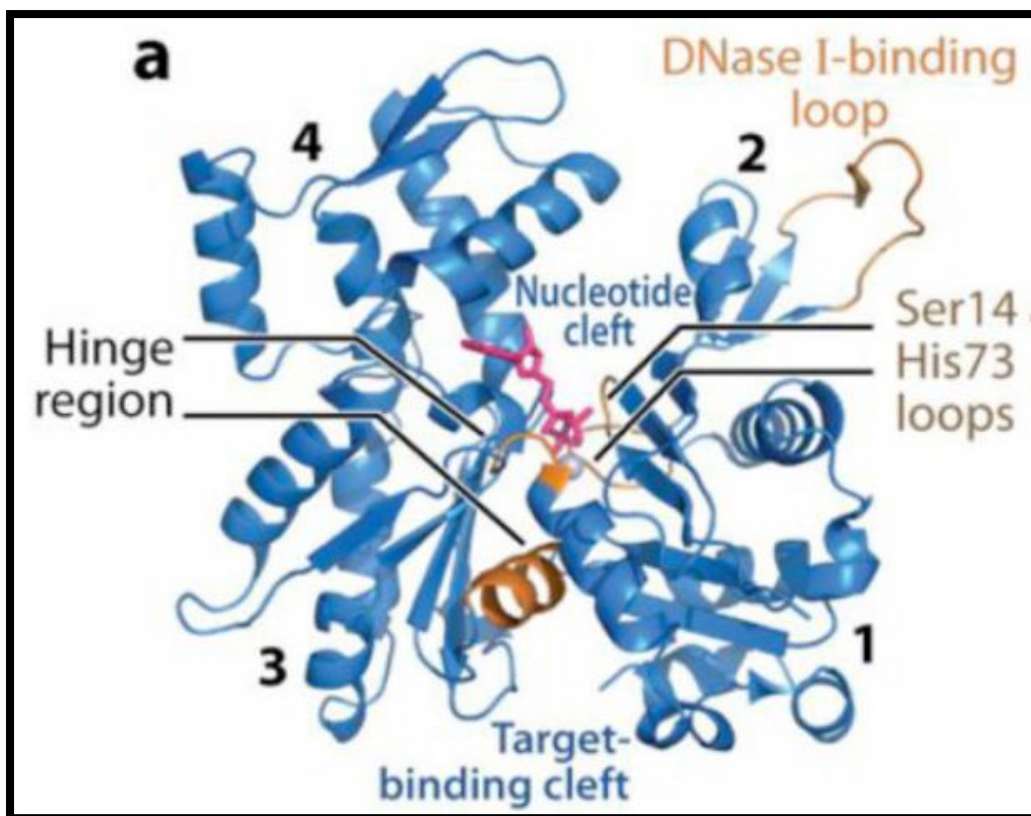


Figura 1.12: Visión clásica de la estructura del monómero de actina. Fuente: Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. Annu Rev Biophys. 2011; 40: 169-186.

Cuando los monómeros de actina (llamada actina-G) polimerizan y forman filamentos, la actina pasa a denominarse actina-F, formando los llamados microfilamentos. La actina-F tiene una estructura filamentosa interpretable como una hélice levógira monocatenaria con giro de 166° y translación axial de $27,5 \text{ \AA}$ o bien como una hélice dextrógira bicatenaria, estando cada actina rodeada de otras 4. Sin embargo, hablar de estructura no es correcto para algo tan dinámico como es un filamento de actina. En realidad se debería hablar de distintos estados estructurales, entre los cuales el dato más constante es la translación axial de $27,5 \text{ \AA}$, mientras que la rotación de las subunidades muestra una considerable variabilidad, siendo normal encontrar desplazamientos de hasta el 10% de su posición ideal.

Puesto que todas las subunidades de un microfilamento apuntan al mismo extremo, se dice que el polímero presenta polaridad en su estructura. Este hecho da lugar a una convención: se nombra al extremo que posee una subunidad de actina exponiendo el lugar por el que se une ATP al medio como "extremo (-)", mientras que en el opuesto, en el cual la hendidura está dirigida a otro monómero adyacente, es el "extremo (+)" ⁽⁷²⁾. En el músculo, el filamento helicoidal de la actina F contiene también una molécula de tropomiosina, una proteína de unos 40 nm que se enrolla alrededor de la hélice de actina F. Durante el estado de reposo celular, la tropomiosina recubre los sitios activos de la actina, de modo que no se logra la interacción actina-miosina que produce la contracción muscular.

La actina como proteína se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo celular. Dicha localización está regulada por las vías de transducción de señales que integran los estímulos que la célula recibe y que permite la

reestructuración de las redes de actina en respuesta a aquellos. Los microfilamentos (nombre que se da a los filamentos de actina-F) intervienen en el movimiento de todas las células móviles, incluso las no musculares. También colaboran en el desplazamiento de sustancias a nivel intracelular, transducción de señales del exterior de la célula, contracción muscular junto con la miosina, citocinesis, apoptosis, adhesión celular, modulación de la expresión génica y en la dinámica de los estereocilios.

I.C.2.5. Filamina.

La filamina (también llamada filamina no muscular, FLN-a, proteína de unión a la actina o ABP) es una fosfoproteína homodimérica, que entrecruza los filamentos de actina en una malla tridimensional citosólica. Es la proteína más eficiente en iniciar la gelación de la actina F, uniendo además el citoesqueleto periférico de actina con la membrana celular a través de su dominio C-terminal de unión a glicoproteínas. Cada subunidad tiene un peso molecular de 280 kDa, y está constituida por unos 2.647 aminoácidos cada una. Los dominios funcionales de cada subunidad incluyen una región N-terminal (con estructura de α -hélice) de unión a actina F, también conocida como ABD (*Actin-Binding-Domain*, dominio de unión a actina); dicha unión está regulada por calcio/calmodulina. También tiene un dominio C-terminal de auto-unión y de unión a glicoproteínas de membrana^{(73), (74)}.

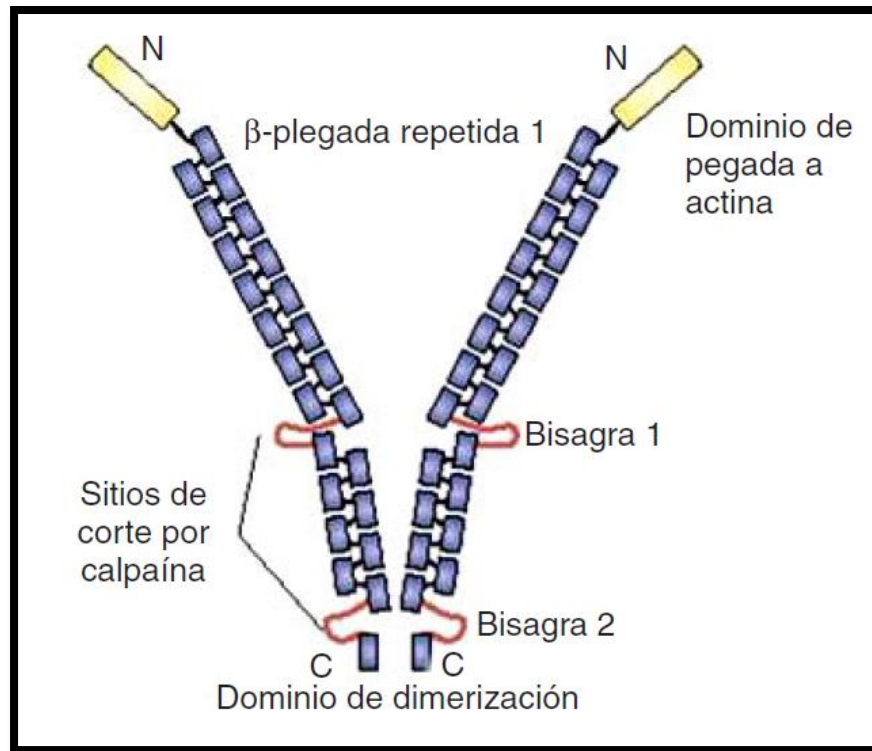


Figura 1.13: Estructura de la filamina humana FLN-a. Fuente: García E, Jay D. Filamina plaquetaria: una proteína del citoesqueleto integradora de la función celular. Arch Cardiol Mex. 2006 Oct-dec; 76 Suppl 4: S67-75.

Existen tres isoformas de filamina en mamíferos, A, B y C. La filamina A se encuentra ampliamente distribuida en células no musculares, por ejemplo plaquetas y células endoteliales. La filamina B se encuentra principalmente en células musculares, y la filamina C se encuentra en músculo esquelético y cardíaco en edad adulta. Los tres isotipos muestran entre sí un 60-80% de homología en las secuencias completas, con excepción de las dos regiones bisagra, las cuales muestran grandes divergencias.

La estructura de los dímeros de filamina es similar a una inmunoglobulina, su estructura flexible puede inducir ramificaciones ortogonales de la actina F de gran ángulo ⁽⁷³⁾.

Las principales funciones de la filamina consisten en ⁽⁷⁴⁾:

- Organización de los filamentos de actina y estabilización de membrana: la filamina permite el entrecruzamiento de los filamentos de actina, formando redes ortogonales. Aumentando la proporción de filamina respecto a la actina, se consigue la formación de redes de actina más estrechas. Si aumenta aún más la proporción (a razón de 1:10-50), se forman paquetes de filamentos de actina paralelos. La formación de haces paralelos o redes ortogonales no sólo depende de la concentración de filamina, sino también de la isoforma de la misma: la filamina presente en las células musculares tiende a formar rígidos haces de actina en vez de redes ortogonales.
- Anclaje de proteínas transmembrana: varios de los dominios repetidos de las filaminas se unen a una gran variedad de proteínas, incluidos receptores transmembrana como la glicoproteína Ib α (subunidad del receptor del factor de von Willebrand) y las integrinas, así como moléculas de señalización, como pequeñas GTPasas y Kinasas. La mayoría de estas interacciones implican al extremo C-terminal de la filamina.
- Servir de soporte a determinadas moléculas de señalización: varias GTPasas de la superfamilia Ras pueden unirse a las repeticiones en el extremo C-terminal de la filamina. De esta forma, la filamina actúa como un andamio donde se localizan las GTPasas, asegurando una correcta localización de las mismas de cara a favorecer la nucleación de la actina, participar en la

dinámica de la actina y el transporte de vesículas. También sirve de soporte para determinadas kinasas como la MKK-4.

I.C.2.6. Tropomiosina.

La tropomiosina es el componente central de la máquina reguladora de la contracción del músculo esquelético, y está formada por dos cadenas α , que a su vez giran la una respecto de la otra en forma de hélice superenrollada, de aproximadamente 20 Å de diámetro y 400 Å de longitud, que subyace en los surcos de las hélices de actina en los microfilamentos (75)⁽⁷⁶⁾. Se han identificado al menos unas 20 isoformas de la molécula.

Como se ha comentado anteriormente, la tropomiosina tiene una función reguladora de la contracción muscular, junto con la troponina. En estado de reposo, la tropomiosina bloquea el lugar de unión de la actina con la miosina. La troponina (formada por tres subunidades, TnT, TnC y TnI) se une a la tropomiosina en determinados puntos concretos, y a su vez poseen un punto de unión específico para el calcio. Cuando aparece un potencial de acción en la membrana plasmática de la fibra muscular, hay una liberación de iones calcio procedente del retículo sarcoplásmico. Como consecuencia de un aumento de la concentración de calcio en el líquido intracelular, éste se une a la troponina induciendo un cambio conformacional en la troponina, provocando que la tropomiosina se desplace y deje libre el sitio activo de la actina, de forma que la miosina ya puede interactuar con ella⁽⁷⁷⁾.

I.C.2.7. Vimentina.

La vimentina es una proteína de 57 kDa que constituye filamentos en células de origen mesodérmico (fibroblastos, adipocitos, condrocitos, osteocitos, músculo liso y estriado, células epiteliales de origen mesodérmico, células de Schwann, melanocitos, células endoteliales, células gliales). Estos filamentos pertenecen a los denominados filamentos intermedios, llamados así porque poseen un diámetro más grueso que los microfilamentos (8-10 nm). Estos filamentos no parecen intervenir en el movimiento celular, siendo su función principal estructural. La vimentina, junto con la desmina (con la que coexiste en muchos casos), constituye los filamentos intermedios más extendidos.

Los filamentos de vimentina se distribuyen fundamentalmente alrededor del núcleo, desde donde se irradian hacia la membrana plasmática. Se ha supuesto que estos filamentos mantienen la localización del núcleo, y probablemente del centriolo y del complejo de Golgi, proporcionándoles un soporte mecánico y fijando su posición. En el músculo estriado rodean los discos Z, junto con la desmina. También se ha visto, utilizando anticuerpos anti-vimentina, que estos filamentos rodean los cromosomas durante la mitosis, y se reparten con ellos entre ambas células hijas ⁽⁷⁸⁾. En la última década, también se ha documentado que la vimentina puede jugar un papel importante en el inicio de la señalización que desencadena la apoptosis celular. Determinadas caspasas (familia de proteasas cisteína-aspartato dependientes), fundamentalmente las caspasas 3 y 7 escinden las moléculas de vimentina en determinadas posiciones, hecho que precede a la dramática reorganización del citoesqueleto que sucede durante la apoptosis celular. La escisión proteolítica

de la vimentina genera un producto (llamado vimentina truncada), que es capaz de inducir por sí mismo la apoptosis, e interfiere con el ensamblaje de los filamentos intermedios. Sin embargo, esta apoptosis inducida sigue dependiendo de la activación de las caspasas. Por lo tanto, la integridad de las moléculas de vimentina en la célula confiere resistencia a la apoptosis ^{(79), (80)}

I.C.2.8. Anexinas.

Las anexinas son una familia de proteínas estructuralmente relacionadas, que comparten la propiedad de unirse a los fosfolípidos, unión que depende del calcio ⁽⁸¹⁾. A principios de los años 80 se descubrieron los primeros miembros de esta familia, pero fueron tratadas como elementos independientes. Así, la anexina 7 se denominó sinexina, las anexinas 1,2,4 y 6 se llamaron cromobindinas, etc. Posteriormente, a finales de los años 80 se descubrió que existían rasgos comunes en todas estas proteínas, tanto a nivel de comportamiento bioquímico como en la estructura del gen y de la proteína. Fue entonces cuando se decidió agrupar a todas ellas con el denominador común de anexinas. Bajo esta denominación se conocen 160 anexinas expresadas en más de 65 especies, desde los hongos hasta los vertebrados superiores.

Las anexinas se clasifican en 5 grandes subfamilias: A (anexinas de vertebrados), B (anexinas de invertebrados), C (anexinas de hongos y relativos), D (anexinas de plantas) y E (anexinas de procariotas). Cualquier molécula de la familia de las anexinas debe cumplir dos criterios básicos: tener la capacidad de unir fosfolípidos acídicos de forma dependiente de calcio y en

segundo lugar, contener una estructura altamente conservada de 70 aminoácidos, llamada "repetición anexina". Esta estructura es la que contiene los lugares de unión al calcio y a los fosfolípidos.

El extremo N-terminal es muy variable en todas las anexinas, tanto en longitud como en secuencia y conformación. En cambio, el extremo C-terminal (o "núcleo" de las anexinas) es muy similar en secuencia y conformación, constituye la parte principal de la molécula y confiere a la proteína las funciones que caracterizan a la familia. La base estructural es la "repetición anexina", la cual se organiza en tándems de 4 repeticiones, separadas por cortas regiones espaciadoras no tan conservadas. La estructura final del núcleo, bastante hidrofílico, se compacta secuestrando en el interior las regiones más hidrofóbicas de α -hélice, dando lugar a una conformación de disco, ligeramente curvado y dando, por lo tanto, una cara cóncava y otra convexa ⁽⁸²⁾.

Aunque falta por determinar de forma definitiva su función *in vivo*, las anexinas tienen un amplio espectro de funciones biológicas. Las mejor documentadas incluyen la agregación y fusión de membranas, participa en los procesos de endocitosis y exocitosis, efectos antiinflamatorios mediados por la inhibición de la fosfolipasa A2, la interferencia con el reclutamiento de granulocitos, la migración y la activación en el lugar de la inflamación, anticoagulación (la anexina A2 puede unirse al plasminógeno y al activador tisular del plasminógeno -t-PA-, siendo esta unión inhibida por la homocisteína, lo que podría explicar el papel aterotrombótico de esta última), interacción con el citoesqueleto de actina, y una función enzimática en el metabolismo del inositol fosfato ^{(81), (83)}. A propósito de la anexina A2 mencionada, se ha encontrado una expresión aumentada de la misma en los aneurismas de aorta

abdominal, fundamentalmente en los estadios tempranos de la enfermedad, cuando el aneurisma es de pequeño tamaño. Esta expresión aumentada podría estar en relación con la activación del plasminógeno y del t-PA, que llevaría a la activación de las metaloproteasas responsables de la degradación de la matriz extracelular y la consecuente formación de los aneurismas. Se ha observado también una relación inversa débil, aunque significativa, entre el tamaño del aneurisma y la cantidad de anexina A2 encontrada ^{(84) (85)}.

Aunque la propiedad de unión a los fosfolípidos es compartida entre todas las anexinas, existe variabilidad entre los diferentes miembros de esta familia de proteínas en cuanto a la sensibilidad al calcio y la especificidad a un determinado subgrupo de fosfolípidos ⁽⁸³⁾. La anexina A5 muestra una importante afinidad por el fosfolípido fosfatidilserina, el cual se encuentra en circunstancias normales en la cara interna de la membrana plasmática de las células. Durante las primeras etapas de la apoptosis, este fosfolípido se trasloca y se expone en la cara externa de la membrana plasmática. De hecho, la anexina A5 marcada fluorescentemente se une a las células que expresan dicho fosfolípido en la membrana celular, permitiendo la identificación de las células que se encuentran en fase de apoptosis. Aunque la función de la anexina A5 no está del todo identificada, es probable que participe en el proceso de apoptosis como un inhibidor de la misma ⁽⁸⁶⁾. También se ha utilizado anexina A5 radiomarcada para observar la actividad biológica en el trombo mural de los aneurismas de aorta abdominal, en experimentos en ratas y con trombo mural de aneurismas humanos en experimentos *in vitro* ⁽⁸⁷⁾, dado que en la cara interna del trombo mural de los aneurismas de aorta se encuentra fosfatidilserina expuesta por las plaquetas.

Esta unión específica a los fosfolípidos de membrana, sobre todo a la fosfatidilserina, otorga a la anexina A5 un importante papel antitrombótico, como se ha visto en algunos estudios *in vitro*^{(88), (89)}. Esto se produce al unirse la anexina A5 a la superficie de los fosfolípidos de membrana mostrados en la cara externa de la membrana plasmática de las plaquetas, bloqueando así la acción de determinados factores de coagulación (como por ejemplo el factor VIIIa y el Va), dado que éstos se unen a la fosfatidilserina durante el proceso de coagulación⁽⁸⁸⁾.

I.C.2.9. Bcl-2.

La familia de proteínas Bcl-2 (extraído del inglés *B-cell lymphoma 2*) es una familia de proteínas formada por alrededor de al menos 17 miembros⁽⁹⁰⁾, que regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en la regulación de la apoptosis celular. Aunque no es estrictamente una proteína estructural, dada su capacidad para convertirse en proteína integral de membrana⁽⁹¹⁾ y el papel que la apoptosis juega en el desarrollo de los aneurismas de aorta, se ha incluido esta reseña en el presente estudio.

El nombre de esta familia deriva de su proteína "fundadora", derivada del protooncogén Bcl-2, uno de los primeros genes descubiertos implicados en la supervivencia celular en mamíferos⁽⁹²⁾. La familia Bcl-2 contiene tanto miembros anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-X_L) como pro-apoptóticos (Bax, Bak, Bad, Bik). Estas proteínas se encuentran fundamentalmente en la membrana externa mitocondrial, retículo endoplásmico y membrana nuclear⁽⁹³⁾. Las

proteínas de esta familia contienen hasta 4 dominios con secuencia homóloga (dominios homólogos de Bcl-2), llamados BH1, BH2, BH3 y BH4.

Los miembros de esta familia se clasifican en tres grupos funcionales o sub-familias ^{(90), (91)}:

- Sub-familia Bcl-2: compuesta por proteínas anti-apoptóticas, que generalmente contienen los 4 dominios BH. Son las proteínas responsables de proteger a las células frente al estímulo apoptótico. Pertenecen a esta familia las proteínas: Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bcl-w, A1/Bfl-1 y Bcl-B/Bcl2L10 ⁽⁹⁰⁾.
- Sub-familia Bax: estas proteínas son pro-apoptóticas, y suelen presentar homología en los dominios BH1, BH2 y BH3, pero no en el BH4. Las proteínas que pertenecen a esta familia son Bax, Bak y Bok/Mtd.
- Sub-familia con dominio único BH3: todos los miembros son pro-apoptóticos, y como su nombre indica sólo presentan el dominio BH3. Estas proteínas son activadas en respuesta a diferentes estímulos de estrés celular, incluyendo daño en el ADN, falta de factores de crecimiento y estrés del retículo endoplásmico. Bid, Bim, Puma, Noxa, Bad, Bmf, Hrk, y Bik pertenecen a esta sub-familia.

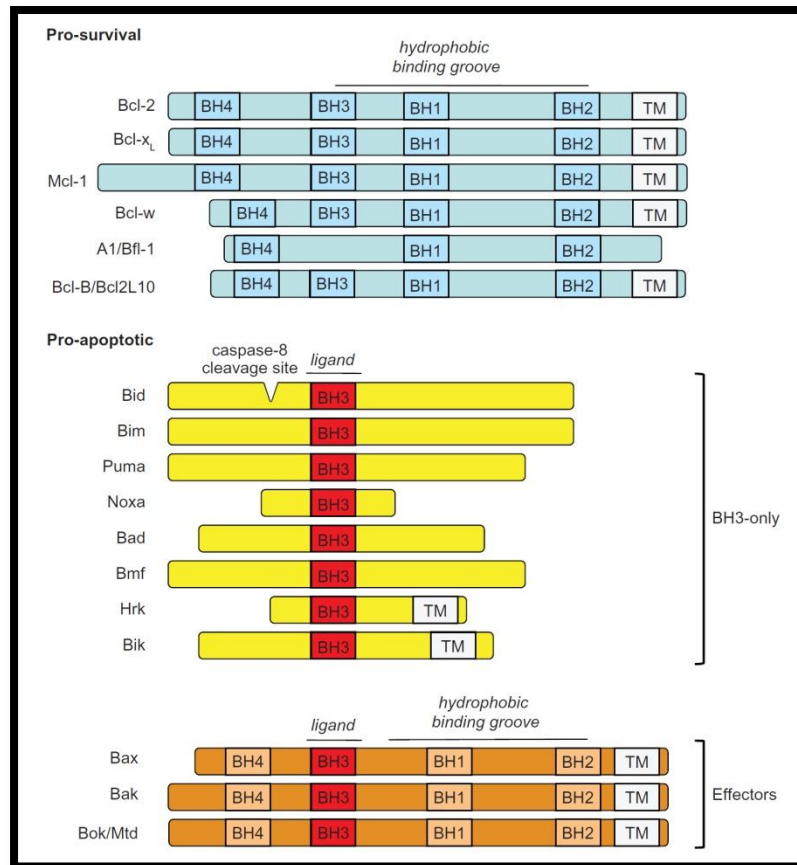


Figura 1.14: Esquema de la familia de proteínas reguladoras de la apoptosis Bcl-2, divididas en sus tres grupos principales. Tomado de: Dewson G, Kluck RM. Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. Cell Health and Cytoskeleton. 2010 Mar; 2: 9-22.

El dominio BH3 se encuentra presente en todos los dominios pro-apoptóticos, y parece que es esencial para la heterodimerización de los miembros de la familia ⁽⁹⁴⁾. Esta heterodimerización está mediada por la inserción de este dominio en el bolsillo hidrofóbico compuesto por los dominios BH1, BH2 y BH3 de las proteínas anti-apoptóticas. Algunos de los miembros de pro-apoptóticos tienen este dominio escondido, y la activación por un estímulo pro-apoptótico supone un cambio conformacional en la proteína que expone al exterior este dominio BH3 (esto ocurre, por ejemplo, con Bax y Bak ^{(95), (96)}).

Los miembros de la familia Bcl-2 interactúan de una forma dinámica para regular la apoptosis. Los miembros pro-apoptóticos como Bax pueden

heterodimerizar con los anti-apoptóticos como Bcl-2 y bloquear su acción anti-apoptótica. Por lo tanto, la relación en los niveles de expresión de proteínas apoptóticas y anti-apoptóticas determina si la célula va a sufrir la apoptosis o no tras un estímulo apoptótico. Cuando existe un exceso de Bcl-2 las células están protegidas de la muerte celular, sin embargo, cuando hay mayor cantidad de proteína Bax la célula está avocada a la apoptosis ⁽⁹¹⁾.

Los miembros de la familia Bcl-2 parecen tener localizaciones subcelulares diferentes, ya que mientras los miembros anti-apoptóticos suelen encontrarse como proteínas integrales en las membranas del núcleo, del retículo endoplásmico y sobre todo en la mitocondria, los pro-apoptóticos están presentes principalmente en el citosol o asociados al citoesqueleto ^{(97), (98)}.

La manera en que la proteína Bcl-2 y sus homólogas anti-apoptóticas protegen a la célula de la muerte no se conoce con exactitud. Se han especulado que puede actuar como un "limpiador" de radicales libres, suprimiendo por tanto el daño oxidativo producido por estos. También se ha propuesto su papel como estabilizador de la membrana mitocondrial, bloqueando la salida al citoplasma de radicales libres y otras proteínas como el citocromo C y Smac/DIABLO, las cuales una vez liberadas en el citosol activan las proteínas caspasas, que desencadenan la secuencia de sucesos que llevan a la apoptosis ⁽⁹⁰⁾.

Una vez que la señal apoptótica llega a la célula, los miembros pro-apoptóticos sufren un cambio conformacional, de forma que sus dominios BH3 quedan expuestos, y puedan por tanto bloquear la acción de las proteínas anti-apoptóticas. Determinadas proteínas pro-apoptóticas (como Bax y Bak)

dimerizan, se anclan en la membrana mitocondrial y forman poros que permiten la salida del citocromo C y otras moléculas pro-apoptóticas. Posteriormente las caspasas son activadas, y se desencadena la apoptosis^{(90), (91)}.

Además de la membrana plasmática mitocondrial, existen otros niveles en los que actúan las proteínas de la familia Bcl-2. La proteína Bcl-X_L puede interaccionar indirectamente con la caspasa-8, y directamente con Apaf-1 o Apaf-1/caspasa-9. De esto se propone que Bcl-X_L secuestra a estas caspasas para evitar su activación⁽⁹⁹⁾. Asimismo, en la membrana del retículo endoplásmico, y por tanto en la envoltura externa del núcleo se encuentran en abundante cantidad tanto Bcl-2 como Bcl-X_L. Allí ejercen su actividad anti-apoptótica heterodimerizando con miembros pro-apoptóticos y secuestrando caspasas⁽¹⁰⁰⁾.

I.D. Proteómica.

La proteómica o técnica de electroforesis bidimensional (2-DE) se ha establecido como uno de los métodos de separación proteica más potentes y útiles en la actualidad. Se trata de una técnica relativamente reciente, que comenzó a emplearse a finales de los años 70 como herramienta analítica para la separación y caracterización proteica^{(101), (102)}. No fue hasta 1995 cuando se utilizó el término “proteómica” para describir la caracterización del conjunto de todas las proteínas presentes en una célula, fluido o tejido en un momento dado⁽¹⁰³⁾. A finales de los años 80, a raíz de la aparición de las membranas PVDF⁽¹⁰⁴⁾ (*polyvinylidene difluoride*, fluoruro de polivinilideno) y la primera base de datos para geles bidimensionales, esta tecnología comenzó a ganar

popularidad entre la comunidad científica. Con el paso de los años aparecieron y se mejoraron nuevos métodos de preparación y extracción proteica de las muestras, así como distintas herramientas de secuenciación (como el método de secuenciación EDMAN ⁽¹⁰⁵⁾), lo que llevó a esta técnica a tener una mayor importancia como método preparativo y de análisis de proteínas de los distintos tipos de muestras.

Posteriormente esta tecnología ha ido evolucionando convirtiéndose poco a poco en un instrumento importantísimo para el estudio de diferentes patologías ^{(106), (107)}. El auge de la proteómica comenzó a partir de los años 90, coincidiendo con el comienzo de la era de la espectrometría de masas (técnica de apoyo fundamental para el estudio proteómico), permitiendo realizar estudios cada vez más exhaustivos.

El proteoma de un organismo es el conjunto de proteínas complementarias del genoma funcional ⁽¹⁰⁸⁾. A diferencia del genoma, el concepto de proteoma es dinámico, varía en función del tipo de célula, de su estado funcional y cambia de forma característica e inmediata en respuesta a determinados estímulos externos (citoquinas, estados inflamatorios, enfermedades, etc.). Este conjunto de proteínas presentes en un tejido, fluido corporal u organismo es en realidad un subconjunto de todos los posibles productos del genoma en un momento dado, de forma que el proteoma no puede deducirse a partir de la información estática del genoma ⁽¹⁰⁸⁾. El mapa proteómico no sólo abarca las proteínas procedentes de la transcripción y traducción directa del genoma, sino que incluye todas aquellas proteínas generadas por distintas modificaciones post-traduccionales. Todas estas modificaciones y otros cambios secundarios a estímulos ambientales

condicionan el desarrollo de diferentes mapas de expresión proteica, es decir, diferentes fenotipos (Figura 1.15). En resumen, mientras que el genoma es relativamente constante (incluso podría considerarse como un componente estático de la célula), el proteoma está continuamente cambiando ⁽¹⁰⁸⁾.

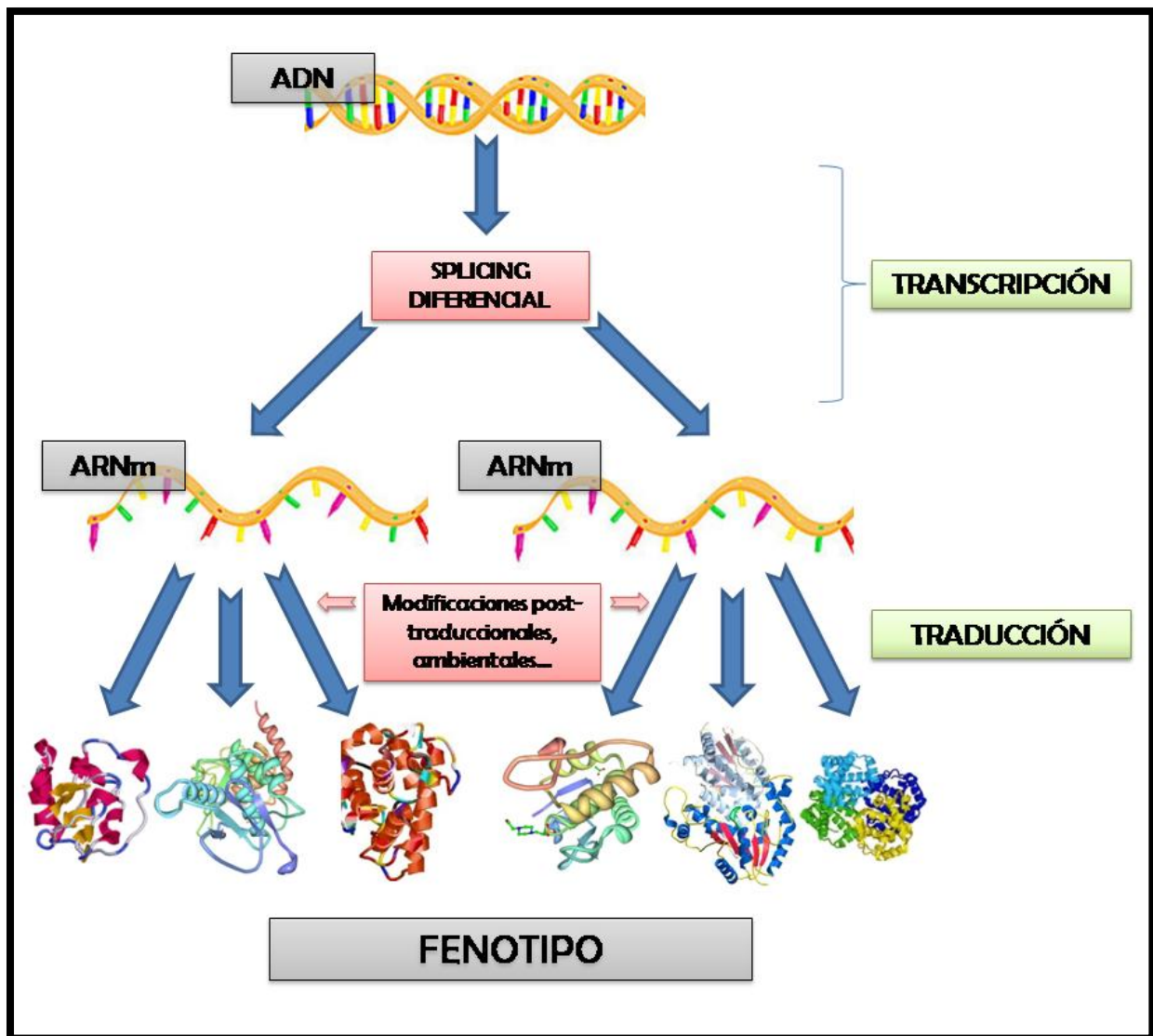


Figura 1.15: Esquema que muestra las diferentes fases de la expresión proteica y su variabilidad a partir de un único gen.

Uno de los mayores logros de la ciencia biomédica realizado en los últimos años fue la secuenciación del genoma humano, que permitió la creación de una gran base de datos. Todo ello, junto a la aparición de nuevas herramientas informáticas que permiten la integración genómica-proteómica, contribuirá al mejor entendimiento de los mecanismos implicados en la aparición y desarrollo de una enfermedad en concreto.

La proteómica implica la separación, identificación y caracterización de la naturaleza y posición de las modificaciones proteicas. La técnica de la proteómica resulta de la combinación de otras técnicas: electroforesis bidimensional, análisis de imagen, espectrometría de masas y bioinformática. Debe permitir obtener información cualitativa y cuantitativa, de forma que se pueda detectar la presencia o ausencia de una determinada proteína en la muestra, así como variaciones en su expresión ante distintos estímulos como puede ser el tratamiento con un fármaco o la simple comparación entre la situación normal frente a una patológica.

Esta tecnología permite detectar la existencia de diferentes isoformas de una proteína, y analizar las posibles variaciones en su expresión, algo que hasta hace relativamente poco era casi imposible con las técnicas disponibles.

Más allá de la mera descripción de las proteínas de una muestra, la proteómica pretende establecer, en último término, la estructura, actividad biológica, mecanismo de acción, localización celular, modificaciones post-traduccionales e interacción con otras proteínas o moléculas, de forma que nos permitan entender cómo se desarrolla una enfermedad, y poder predecir en

cierto modo cómo su función puede verse alterada por la utilización de un fármaco concreto o por una manipulación genética.

Muchas son las aplicaciones que esta técnica puede tener en diferentes campos científicos y tecnológicos, aunque quizá la que mayor impacto comercial tenga sea la del diseño de nuevos fármacos y el diagnóstico molecular. El objetivo final es la construcción de un mapa tridimensional celular, con la localización de cada proteína, y los procesos y cambios a los que pueden someterse, permitiendo la mejor comprensión de los mecanismos moleculares implicados en cualquier proceso metabólico o patológico ⁽¹⁰⁸⁾.

I.D.1. Fundamentos de la técnica.

I.D.1.1. Electroforesis bidimensional.

El primer paso para la realización de un estudio proteómico consisten en someter a las proteínas presentes en una muestra a un proceso de doble electroforesis: electroforesis bidimensional (2-DE, *2-dimensional electrophoresis*). Mediante esta técnica se puede analizar cualquier muestra en la que existan proteínas, ya sean extractos celulares, tejidos, órganos o fluidos corporales.

Este primer paso va a permitir la separación de las proteínas en dos dimensiones, definidas por dos de las características más representativas de una proteína, como son el peso molecular y el punto isoeléctrico (pH en el cual la carga neta de la proteína es 0). Dependiendo de estas dos características

únicas y exclusivas de cada proteína, tras la doble electroforesis obtendremos un mapa de expresión proteico, de forma que cada proteína puede ser identificada según un sistema de coordenadas en el que los dos ejes son el peso molecular y el punto isoeléctrico. "Las coordenadas" son únicas para cada proteína, por lo que podría considerarse como el documento de identidad de la misma ⁽¹⁰⁹⁾. En la figura 1.16 se resumen los pasos de la doble electroforesis.

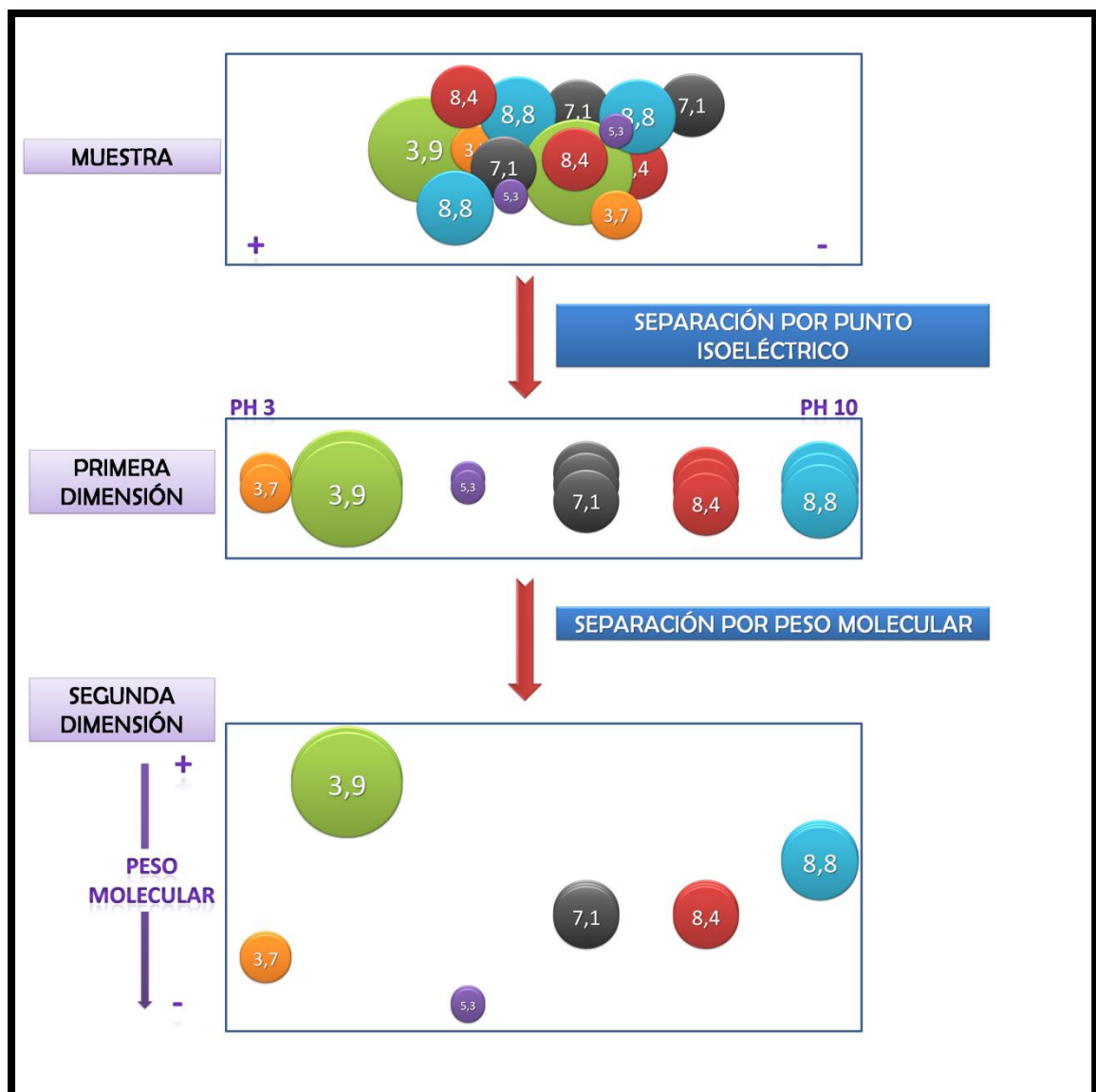


Figura 1.16: Electroforesis bidimensional. De la muestra problema se realiza una primera separación de las proteínas según su punto isoeléctrico, y posteriormente son separadas por peso molecular.

La mayoría de las veces el orden de separación de las proteínas es éste, primero por punto isoeléctrico y después por peso molecular, por razones económicas (la segunda separación es preferible que sea la más barata) y técnicas (los geles utilizados para la separación de proteínas por peso molecular se tiñen más fácilmente que los geles isoeléctricos) (108). Sin embargo, se han publicado trabajos en los que el orden de separación es inverso (110), (111).

Las modificaciones post-traduccionales de las proteínas son detectables con esta técnica, ya que dichas modificaciones confieren a las proteínas un cambio tanto de carga como de peso molecular, y por lo tanto, apareciendo en el gel de electroforesis en un lugar diferente de su posición habitual.

I.D.1.1.a) Preparación de las muestras.

Antes de comenzar con la separación, se deben solubilizar las proteínas de la muestra sin añadir modificaciones durante el proceso, y eliminar otros componentes biológicos de la muestra que puedan interferir en la separación de proteínas. Las sustancias que se utilicen para ello no deben estar cargadas, ya que la carga de las proteínas no puede alterarse^{(112), (113)}. El detergente CHAPS es el más utilizado habitualmente.

Respecto al campo eléctrico a utilizar en la separación, y dado que la carga de las proteínas va disminuyendo constantemente hasta alcanzar el punto isoeléctrico, deben utilizarse campos eléctricos de gran fuerza para que en los últimos milímetros las proteínas migren a una velocidad decente. Se

usan campos de hasta 170 V/cm en el punto isoeléctrico, mucho mayor que el empleado en la electroforesis SDS (15 V/cm).

I.D.1.1.b) Primera dimensión.

En esta fase se utilizan tiras de gel de poliacrilamida con un gradiente de pH inmovilizado (IPG, *Isoelectric Phocusing Gradient*). Se aplica una corriente eléctrica, de forma que las proteínas presentes en la muestra migran a lo largo de la tira IPG, hasta que alcanzan su punto isoeléctrico (punto donde la carga neta de la proteína es 0), y se detienen.

I.D.1.1.c) Segunda dimensión.

El gel utilizado en esta fase es un gel SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) donde las proteínas se separarán según su peso molecular. El SDS es un detergente aniónico que se emplea para alinear las proteínas y aplicar una carga negativa a cada proteína proporcional a su masa. Esta segunda dimensión permite la identificación de nuevas proteínas y, además, la medición de la abundancia relativa entre diferentes muestras.

I.D.1.1.d) Detección de las proteínas.

Para poder analizarlas, las proteínas separadas en la segunda dimensión deben poder visualizarse, para lo que se procederá a teñir el gel.

Existen distintos tipos de tinción de geles, que se diferencian fundamentalmente en su sensibilidad para la detección de proteínas. Las más utilizadas son la tinción de *Coomassie*, la tinción radiactiva, la fluorescente y la tinción con nitrato de plata, destacando esta última por su sensibilidad, su durabilidad en el tiempo y por su calidad de imagen ^{(114), (115)}. La tinción con nitrato de plata es compatible con el análisis por espectrometría de masas, el cual se empleará en fases posteriores del estudio proteómico.

I.D.1.2. Análisis de la imagen.

Tras la separación de proteínas es necesario analizar la imagen obtenida en el gel. Existen numerosos programas informáticos (PD-QUEST, MELANIE, etc.) que facilitan esta tarea, al realizar un análisis completo de los mapas de expresión proteica, pudiendo realizar posteriormente una comparación entre diferentes mapas. También es posible comparar con mapas almacenados en bases de datos en internet. La base de datos suiza Swiss-Prot (<http://www.expasy.ch/>) es una de las bases más conocidas y empleadas.

El análisis cuantitativo de las diferentes proteínas estudiadas en los mapas de expresión proteica puede realizarse con determinadas herramientas informáticas, como por ejemplo el programa *QUANTITY-ONE* (*Bio-Rad Laboratories*).

I.D.1.3. Espectrometría de masas (MS).

La aparición y posterior evolución de la espectrometría de masas ha supuesto uno de los avances más importantes en lo que se refiere a identificación proteica ^{(116), (117)}. Se estima que mediante esta técnica pueden detectarse proteínas en geles en rango femtomolar (10^{-15} M/L). La espectrometría de masas es altamente sensible, permite el análisis de mezclas proteicas y puede realizar múltiples análisis, por lo que poco a poco ha reemplazado a la secuenciación por el método EDMAN y actualmente es el método de identificación proteica de elección.

La espectrometría de masas proporciona información sobre la estructura proteica, ya que aporta información sobre la masa peptídica y la secuencia de aminoácidos. Esta información es utilizada para la identificación de las proteínas mediante búsquedas en bases de datos que existen en la actualidad, tanto de proteínas como de nucleótidos. Pueden detectarse así, por ejemplo, el tipo y la localización de una modificación proteica concreta.

El primer paso en la espectrometría de masas consiste en el aislamiento de las proteínas de la muestra. Dado que la MS es menos sensible en el análisis de la proteína íntegra que en el estudio de sus péptidos, y que la masa de una proteína intacta por sí sola no es suficiente para su identificación, las proteínas de la muestra deben ser degradadas con tripsina. De esta forma las proteínas son escindidas en la zona carboxílica de los residuos de lisina y arginina (a no ser que estén seguidos por una prolina), formando un conjunto de péptidos que se conocen como "huella peptídica". A continuación estos péptidos son ionizados tras el tratamiento con láser, lo que les confiere una

carga, y son separados según su ratio masa / carga (ratio m/z). Por último, son analizados por un detector que es capaz de medir la intensidad de cada fragmento, y se genera una lista priorizada de estos péptidos.

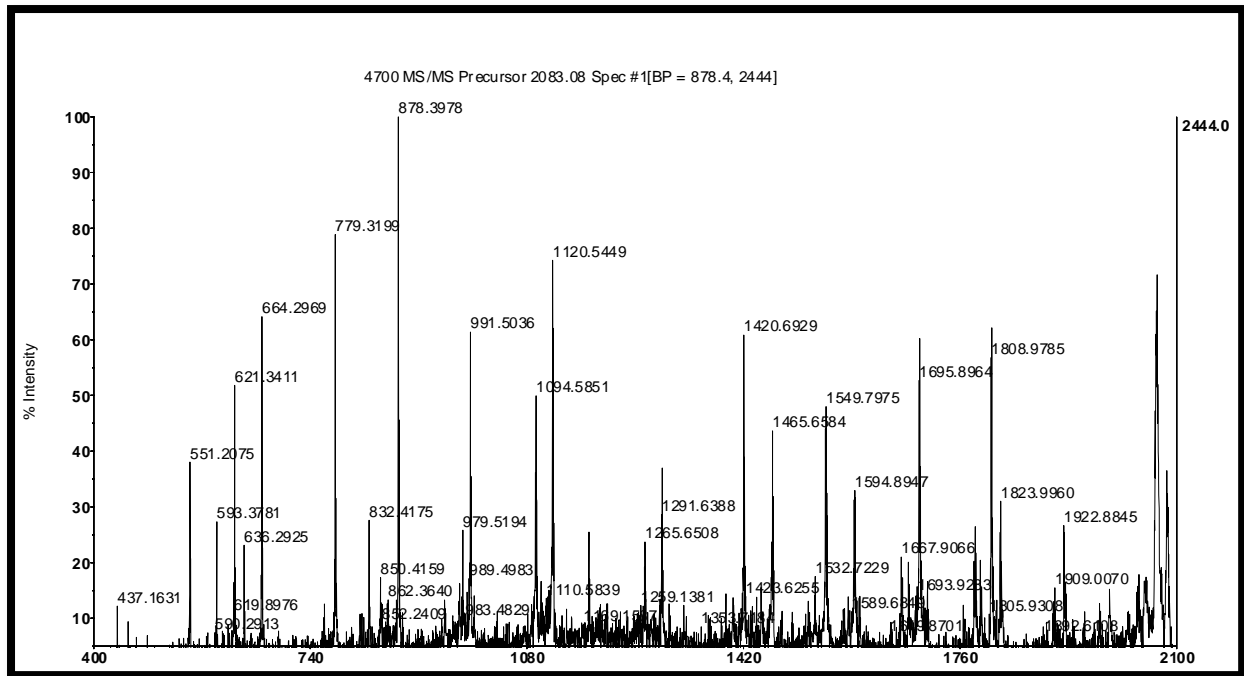


Figura 1.17: Ejemplo de huella peptídica en la espectrometría de masas.

Los resultados obtenidos con el análisis espectrométrico son comparados con determinadas bases de datos (*MS-Fit*, *MASCOT*, *PROFOUND*, *Peptide Search...*), obteniendo la secuencia proteica completa y la identificación de la proteína estudiada.

II. HIPÓTESIS

Como se ha descrito en la introducción de esta tesis, en los aneurismas de aorta abdominal se produce de forma progresiva una inflamación con infiltrado leucocitario de las capas media y adventicia, activación de metaloproteinasas y desestructuración de la matriz extracelular de la pared arterial, lo que conlleva al adelgazamiento de la misma, y a la dilatación progresiva del vaso. También es importante el papel de la apoptosis celular, sobre todo de las células de músculo liso encargadas de la síntesis y depósito de las proteínas que componen la matriz extracelular.

Poco se sabe sobre los efectos de estos procesos en las proteínas estructurales que componen el citoesqueleto, de localización intracelular, y aunque sí que hay más trabajos publicados sobre las proteínas de la matriz extracelular en los aneurismas de aorta abdominal, todavía no está clara su evolución en el desarrollo de los mismos, sobre todo en lo que respecta al colágeno.

Asimismo, y dado que en la cascada de la apoptosis se produce una destrucción en cadena de las proteínas que componen el citoesqueleto, no se conoce hasta qué punto la apoptosis celular puede variar el componente celular

estructural de la pared aórtica aneurismática, y por tanto modificar las características biomecánicas del tejido arterial.

Por lo tanto, y teniendo en cuenta lo que se conoce hasta el momento sobre los aneurismas de aorta abdominal, es previsible que existan (en comparación con el tejido aórtico sano) variaciones en los niveles de expresión proteica de las diferentes proteínas que componen la matriz extracelular, las proteínas estructurales que componen o interactúan con el citoesqueleto, así como las proteínas implicadas en la apoptosis celular. La identificación de esta expresión proteica diferencial puede ayudar a comprender mejor los procesos bioquímicos que se desarrollan en el tejido arterial aneurismático.

III. OBJETIVOS

Los objetivos principales de la presente tesis son:

1. Determinar si existen variaciones en la expresión proteica de las principales proteínas que componen la matriz extracelular (fundamentalmente la elastina y el colágeno), comparando los resultados obtenidos de muestras de aorta aneurismática con tejido aórtico sano.
2. Evaluar si existen diferencias en los niveles de expresión de las proteínas que componen el citoesqueleto entre el tejido aórtico aneurismático y la pared aórtica sana.
3. Comprobar si en los aneurismas de aorta abdominal existe una actividad apoptótica mayor que en la pared arterial normal, a través de la cuantificación de los niveles de expresión proteica

de dos proteínas relacionadas con los procesos apoptóticos, la Bcl-2 y la caspasa-3.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

En la presente tesis se han realizado estudios *in vitro* con el objetivo de demostrar diferencias en el mapa de expresión proteica de la pared aórtica aneurismática en comparación con la expresión proteica del tejido aórtico sano, a través del análisis proteómico de ambos tipos de tejido.

IV.A. Obtención de muestras aórticas.

Las muestras de tejido aórtico aneurismático fueron obtenidas en quirófano durante la reparación aórtica electiva en pacientes con AAA (13 pacientes), todos ellos intervenidos mediante cirugía abierta convencional. Las muestras de AAA fueron obtenidas de la porción más dilatada de la aorta infrarrenal (>5 cm).

Se consideraron como criterios de exclusión para el estudio los siguientes:

- Pacientes con Síndrome de Marfan.

- Pacientes con cualquier tipo de enfermedad inflamatoria sistémica.
- Pacientes con enfermedad oncológica concomitante.
- Pacientes a los que se les haya sometido a un procedimiento quirúrgico en los 6 meses anteriores a la inclusión en el estudio.

El diagnóstico de los pacientes con aneurisma de aorta abdominal se realizó mediante pruebas de imagen, concretamente con tomografía computarizada. Aparte del diagnóstico, dicha prueba permitió la determinación del diámetro aórtico máximo.

Las muestras aórticas sanas (grupo control, muestras de pared aórtica no aneurismática) fueron obtenidas de 12 pacientes durante el trasplante de órganos: se trata de pacientes que han sufrido un traumatismo craneal mayor, con daño cerebral irreversible, candidatos a ser donantes de órganos. Las muestras de tejido fueron obtenidas de la pared aórtica a nivel de la arteria renal, y el diámetro aórtico fue previamente determinado antes de la extracción usando un calibre quirúrgico.

Las muestras de tejido (tanto del grupo control como del grupo de estudio) fueron inmediatamente limpiadas de sangre, grasa y otros tejidos externos, lavados con suero salino isotónico y rápidamente congelados a -80° C hasta la determinación proteómica.

Todas las muestras de tejido aórtico fueron obtenidas tras la firma del consentimiento informado por parte del paciente. En el caso de los donantes de

órganos, el consentimiento fue firmado por la familia del donante. El protocolo del estudio ha sido aprobado por el Comité Ético Institucional del Hospital Clínico San Carlos (Madrid).

IV.B. Determinación de proteínas mediante proteómica.

Para llevar a cabo este análisis se utilizó la proteómica, que, como ya se ha indicado con anterioridad (ver apartado I.D. *Proteómica*), es una nueva tecnología que permite analizar la expresión de múltiples proteínas a la vez en una única muestra. En un estudio proteómico es necesario integrar una serie de tecnologías, como la electroforesis bidimensional, el análisis de la imagen, la espectrometría de masas y la bioinformática, como se muestra a continuación.

IV.B.1. Electroforesis bidimensional (2-DE).

La 2-DE es la base fundamental para el desarrollo de los mapas de expresión proteica o proteomas. Esta técnica permite separar las proteínas en dos dimensiones: según su peso molecular y su punto isoeléctrico. Esta separación bidimensional de las proteínas da lugar a un mapa de expresión proteica en el que cada proteína y sus isoformas estarán distribuidas en la coordenada formada por el peso molecular y el punto isoeléctrico. Esta coordenada es única para cada proteína, es decir, es el documento de identidad de la misma.

IV.B.1.1. Material utilizado.

- Homogeneizador *Ultra-Turrax®* T8 (IKA®-Werke)
- Tampón de rehidratación
- *Kit Pierce®* BCA Protein Assay
- Geles de gradiente de pH inmovilizado (IPG) (*Bio-Rad ReadyStrip™*).
- Sistema PROTEAN® IEF *cell* (Laboratorios *Bio-Rad*)
- Geles de electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE) al 10%
- Sistema PROTEAN® II XL (Laboratorios *Bio-Rad*)
- *Fixative Enhance Concentrate* (Laboratorios *Bio-Rad*)
- *Kit Silver Stain Plus* (Laboratorios *Bio-Rad*)
- Escáner UMAX POWERLOOK III
- Software *ScanMagic V* 4.5
- Programa *Quantity One* 4.2.3 (Laboratorios *Bio-Rad*)

IV.B.1.2. Preparación de las muestras.

Las muestras de aorta fueron aisladas y homogeneizadas con el homogeneizador *Ultra-Turrax®* T8 (IKA®-Werke). Dicho homogeneizador es una unidad de dispersión para conseguir emulsiones y dispersiones con un alto

rendimiento. El *Ultra-Turrax*® T8 (Figura 4.1) es un instrumento de mano de alta calidad, con una potencia de hasta 100 vatios y unas velocidades de 5000 a 25000 por minuto. Gracias al amplio rango de velocidades y que el elemento dispersor tiene un diámetro de 5-8 mm, incluso pequeñas cantidades se procesan y dispersan rápidamente.

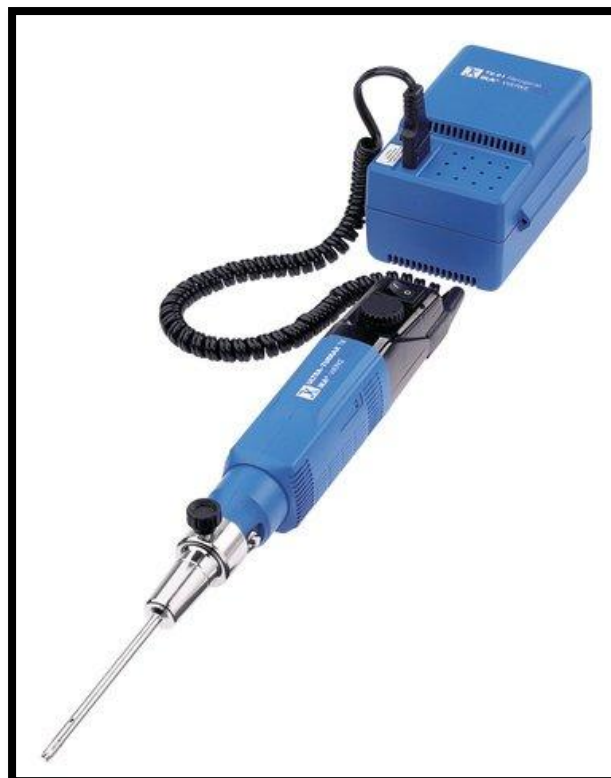


Figura 4.1: Ejemplo del instrumento *Ultra-Turrax*® T8 (fuente: internet: www.sigmaaldrich.com)

Las muestras se homogeneizaron en una solución tampón (*rehydration buffer*) que contenía un agente desnaturalizante (urea), un agente detergente (CHAPS y anfolitos) y un agente reductor (ditiotreitól) en las concentraciones que se exponen a continuación:

- Urea.....8 mol/l
- CHAPS w/v.....2%
- Ditiotreitól.....40 mmol/l
- Anfolitos Bio-LyteTH (Laboratorios *Bio-Rad*, Hercules, Cal).....0.2%
- Azul de bromofenol w/v.....0.01%

Posteriormente, los tejidos homogeneizados se centrifugaron a 10000 g durante 10 minutos y el sobrenadante se congeló a -80 °C hasta su análisis.

IV.B.1.3. Primera dimensión.

La concentración de proteínas se estimó utilizando el *kit Pierce® BCA Protein Assay*. Se trata de una formulación basada en el ácido bicinconínico (BCA), compatible con detergentes, para la detección colorimétrica y cuantificación de las proteínas totales.

El principio del método del ácido bicinconínico (BCA), patentado por *Pierce Biotechnology (Rockford, IL, USA)*, es similar al procedimiento de *Biuret*, en cuanto que ambos se basan en la formación de un complejo Cu^{2+} -proteína

bajo condiciones alcalinas, seguido de la reducción del Cu^{2+} en Cu^{1+} ⁽¹¹⁸⁾. La cantidad de reducción es proporcional a la proteína presente. El BCA forma un complejo azul púrpura con el Cu^{1+} por proteínas en medios alcalinos, de modo que permite monitorizar la reducción de Cu^{2+} por las proteínas a un máximo de absorbancia de 562 nm y de este modo cuantificar las proteínas. La estructura macromolecular de la proteína, el número de uniones peptídicas y la presencia de 4 aminoácidos en particular (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) han sido descritos como los responsables de la formación de color con BCA. La concentración de proteínas se determina en referencia generalmente a una proteína estándar común, como la albúmina bovina.

El ensayo BCA es más sensible y aplicable que los métodos de *Biuret* o de *Lowry*. Además, tiene menos variabilidad que el método de *Bradford*. Entre otras características del ensayo BCA encontramos:

- Método colorimétrico, se lee a 562 nm.
- Compatible con la mayoría de los detergentes iónicos y no iónicos.
- Más rápido y fácil que el método de *Lowry*.
- Todos los reactantes son estables a temperatura ambiente durante 2 años.
- El rango de trabajo varía de 20 a 2000 $\mu\text{g/ml}$.
- El complejo de color es estable.
- Adaptable a microplatos.

- Menor variación proteína-a-proteína que con los métodos de tinción.
- Es aplicable a un amplio rango de concentraciones de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó con referencia al estándar, la albúmina bovina (Figura 4.2).

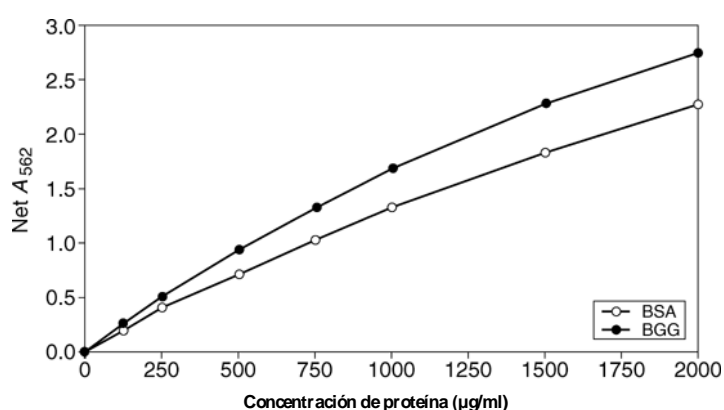


Figura 4.2: Ejemplo de curva de comparación de concentración de proteínas frente a la albúmina bovina.

La cuantificación de las proteínas se realizó siguiendo los pasos que se indican a continuación:

1. Preparación de las diluciones estándar de BSA (albúmina de suero bovino). Las diluciones de BSA se prepararon a partir de ampollas de BSA de 2.0 mg/ml, según el siguiente esquema:

VIAL	VOLUMEN DE DISOLVENTE	VOLUMEN DE DISOLVENTE	CONCENTRACIÓN FINAL BSA
A	700 µl	100 µl del estándar	250 µg/ml
B	400 µl	400 µl del vial A	125 µg/ml
C	450 µl	300 µl del vial B	50 µg/ml
D	400 µl	400 µl del vial C	25 µg/ml
E	400 µl	100 µl del vial D	5 µg/ml
F	400 µl	0	0 µg/ml (blanco)

Tabla 4.1: Diluciones de BSA indicando el volumen de disolvente, la relación volumen/fuente de BSA y la concentración final de BSA (BSA: albúmina de suero bovino).

- Preparación del reactivo de trabajo BCA: se empleó como reactivo el *kit Pierce® BCA Protein Assay*. Para determinar el volumen total de reactivo de trabajo se empleó la siguiente fórmula: $(x \text{ estándar} + x \text{ muestras problema}) \times (n^{\circ} \text{ duplicados}) \times (\text{volumen de reactivo de trabajo por muestras} = 200 \text{ µl}) = \text{volumen total}$. El reactivo de trabajo se prepara mezclando 50 partes de reactivo A (carbonato sódico, bicarbonato sódico, ácido bicinconínico y tartrato sódico en hidróxido sódico 0.1 M) con una parte de reactivo B (sulfato cúprico 4%).
- Se pipetearon 25 µl de cada estándar o muestra problema por triplicado en pocillos.
- Se añadieron 200 µl de reactivo de trabajo a cada pocillo y se mezcló el platillo en un agitador durante 30 segundos.

5. Se tapó el platillo y se incubó a 37 °C durante 30 minutos.
6. Se dejó enfriar hasta temperatura ambiente.
7. Medida de absorbancia a 562 nm.
8. Se restó la absorbancia de la muestra blanco al resto de muestras
9. Se preparó la curva estándar: en el eje de ordenadas la medida de absorbancia; en el eje de abscisas, la concentración conocida de BSA. A continuación, en esta curva se interpolan los valores obtenidos en el resto de muestras problema.

Para la primera dimensión de la 2-DE se cargaron muestras de 250 µg de proteína total en tiras de geles de gradiente de pH inmovilizado (IPG) con un pH de 3 a 10 (*Bio-Rad ReadyStrip™*). El foco isoeléctrico se realizó con el sistema PROTEAN® IEF cell (Laboratorios *Bio-Rad*) durante 3 días y a temperatura ambiente (20°C), como se ha publicado anteriormente ^{(119), (120)}. Este sistema está diseñado para llevar a cabo la primera dimensión y consiste en una fuente de alimentación programable con una plataforma *Peltier* que mantiene la temperatura constante para asegurar la reproducibilidad. El rango de temperaturas varía desde 10 a 25 °C, lo que permite trabajar con un rango más amplio de muestras de proteínas y condiciones. Dicho sistema permite acomodar hasta 24 tiras de 7 cm o 12 de 17 cm para realizar el foco isoeléctrico. Puede ser programado completamente para una rehidratación pasiva o activa (50 V). Las especificaciones técnicas se listan en la Tabla 4.2.

RENDIMIENTO	
Voltaje	50-10000 V, incrementos de 10 V
Corriente	0-2.4 mA, incrementos de 1.0 μ A
Potencia	0-24 W
PLATAFORMA <i>Peltier</i>	
Capacidad	24 tiras de 7 cm o 12 tiras de 11,17,18 ó 24 cm.
Temperatura de operación	10-25 °C
Dimensiones	28 x 30 x 14 cm

Tabla 4.2: Especificaciones técnicas del sistema PROTEAN® IEF cell (Laboratorios *Bio-Rad*).

Como se ha publicado con anterioridad ^{(121), (122)}, los geles fueron rehidratados activamente a 50 V durante 60 horas, seguido de rápidas subidas lineales de tensión y voltaje, limitados por una corriente máxima de 50 μ A por gel ⁽¹²⁰⁾.

IV.B.1.4. Segunda dimensión.

En la segunda dimensión las proteínas de las tiras se separaron según su peso molecular en geles de electroforesis de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico al 10% (SDS-PAGE) utilizando el sistema PROTEAN® II XL (Laboratorios *Bio-Rad*) ^{(120), (123)}. Esta unidad proporciona una gran área de separación de las proteínas, lo que permite analizar muestras con mayor carga y, finalmente, también obtener una mejor resolución respecto a los formatos de gel más pequeños. Las especificaciones técnicas se incluyen en la Tabla 4.3.

SISTEMA PROTEAN® II XL	
Número de geles	1-4
Tamaño del gel	18.3 x 20 cm (altura x longitud)
TAMAÑO DEL PLATO	
Interno	20 x 20 cm
Externo	20 x 22.3 cm
Longitud del espaciador	22.3 cm
Volumen superior del tampón	350 ml
Volumen inferior del tampón	1.2 L
TIEMPOS PARA EL SDS-PAGE	
Sin enfriamiento	5 h
Con enfriamiento	3.5 h

Tabla 4.3: Especificaciones técnicas del sistema PROTEAN® II XL (Laboratorios *Bio-Rad*).

IV.B.1.5. Tinción.

Posteriormente, los geles fueron fijados en una solución con *Fixative Enhance Concentrate* (Laboratorios *Bio-Rad*), etanol y ácido acético en agua destilada durante 20 minutos. Después se utilizó una solución de sensibilización compuesta por acetato sódico y tiosulfato sódico en agua destilada y se lavaron dos veces durante 10 minutos con agua destilada. Entonces los geles fueron teñidos con plata utilizando el kit *Silver Stain Plus* (Laboratorios *Bio-Rad*), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, durante 25 minutos.

El *Silver Stain Plus* es un sistema rápido y sencillo para detectar proteínas en los geles de poliacrilamida tras la electroforesis. Esta tinción con plata es muy sensible, pudiendo detectar incluso cantidades de nanogramos de proteínas. El kit *Silver Stain Plus* contiene los siguientes componentes:

- Concentrado potenciador del fijador.

- Solución de complejo de plata, que contiene NH_4NO_3 y AgNO_3 .
- Ácido tungstosilícico, compuesto por silicio y tungsteno ($\text{H}_4[\text{Si}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4]\cdot\text{H}_2\text{O}$) y que a 20 °C es completamente soluble.
- Formaldehído.
- Carbonato de sodio (Na_2CO_3) como agente acelerador de la tinción.
- Un bote de 1 L vacío

Para la correcta tinción de los geles los contenedores se limpiaron con 50% de ácido nítrico después del detergente de laboratorio. Además, las superficies de los geles estuvieron completamente sumergidas y se evitaron temperaturas superiores a 25 °C. Los geles teñidos se lavaron dos veces con agua destilada durante 5 minutos cada vez.

Es muy importante destacar que la tinción con plata utilizada fue compatible con posteriores pasos de espectrometría de masas (MS). El siguiente paso fueron dos lavados con agua destilada de un minuto de duración cada uno para seguidamente aplicar la solución de revelado compuesta de carbonato sódico y formaldehído en agua destilada. Una vez que los geles alcanzaron el grado de tinción deseado se paró el proceso mediante el empleo de una solución con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) en agua destilada.

IV.B.1.6. Adquisición de imágenes y análisis.

Los geles teñidos fueron escaneados utilizando un escáner UMAX POWERLOOK III operado por el software *ScanMagic V 4.5*. El análisis de la imagen se realizó utilizando el programa *Quantity One 4.2.3* (Laboratorios *Bio-Rad*, figura 4.3). Dicho *software* permite la adquisición, cuantificación y análisis de gran variedad de datos, incluyendo muestras teñidas adquiridas mediante sistemas de geles. Las imágenes fueron configuradas, marcadas y, posteriormente, editadas. A la intensidad del volumen de cada punto le fue sustraída la intensidad correspondiente al fondo y el volumen resultante fue normalizado *in situ* con el valor densitométrico correspondiente a la actina α .



Figura 4.3: Captura de pantalla del programa de análisis de imagen *Quantity One*.

La identificación de cada punto se realizó por comparación con la base de datos *Swiss Prot* (ExPASy). La densidad de los puntos estudiados más importantes se confirmó con espectrometría de masas.

IV.B.2. Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas (MS) es una tecnología analítica esencial en el contexto de la proteómica actual debido a su alta capacidad de análisis, su sensibilidad y su precisión en la determinación de masas moleculares proteicas.

IV.B.2.1. Material utilizado.

- Agua Milli-Q™ (*Merk Millipore*).
- Acetonitrilo (CH₃CN) al 100%.
- Sistema SpeedVac® (*Thermo Scientific*).
- Ditioeritritol (C₄H₁₀O₂S₂).
- Bicarbonato amónico (NH₄HCO₃).
- Iodoacetamida (C₂H₄INO).
- Tripsina (*Promega*®).
- Ácido trifluoroacético (TFA, CF₃COOH).
- Puntas mmol-18 Zip (*Millipore*).
- Matriz de α-ciano 4-hidroxi-trans-cinámico (*Sigma*).
- Placa de MALDI (*Pro MS MALDI Genomic Solutions*, del inglés *Matriz-Assisted Laser Desorption/Ionization*).
- 4700 Proteomic Analyzer (*Applied Biosystem*).

- Calibradores estándar (*Applied Biosystem*).
- 4000 Series Explorer Software (*Applied Biosystems*).
- GPS Explorer Software (*Applied Biosystems*).

IV.B.2.2. Método.

Para la identificación de las proteínas de interés, los puntos se extrajeron manualmente de los geles utilizando un punzón para biopsias ⁽¹²³⁾, ⁽¹²⁴⁾, ⁽¹²⁵⁾. La identificación de cada proteína se llevó a cabo extrayendo el mismo punto de interés en tres geles diferentes. La tinción de plata fue solubilizada y eliminada y los puntos fueron lavados tres veces con agua *Milli-Q™* (*Merk Millipore*). Con este sistema se puede obtener agua ultrapura para este tipo de aplicaciones en el laboratorio, teniendo las siguientes características: un nivel de resistividad de 18,2 MegaOhmios.cm a 25 °C y un nivel de carbonato orgánico total inferior a 10 partes por billón (ppb). Los sistemas *Milli-Q™* constan de varias etapas de purificación, cada una de ellas diseñada para eliminar una determinada gama de contaminantes. Se utilizó el módulo Gradient A10 (Tabla 4.4).

ESPECIFICACIONES	
Resistividad (MΩ.cm) a 25 °C	18.2
Nivel de COT (valores típicos)	1-5
Nivel de pirógenos (Eu/ml)	NE
Bacterias (UFC/ml)	<1
Partículas > 0.22 µm (P/ml)	<1
Caudal (L/min)	1.5

Tabla 4.4: Especificaciones del agua producida por el sistema Milli-Q™ Gradient A10.

Después las muestras se incubaron con acetonitrilo (CH_3CN), utilizado como disolvente, al 100% durante 5 minutos, otros 30 minutos con TFA al 5% y acetonitrilo al 50% y se secaron con un sistema *SpeedVac*® (*Thermo Scientific*).

Como se ha publicado previamente ^{(120), (123), (124)}, las muestras se redujeron con ditioeritritol ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$) en bicarbonato amónico (NH_4HCO_3) y posteriormente fueron alquiladas con iodoacetamida ($\text{C}_2\text{H}_4\text{INO}$), un inhibidor irreversible de todas las cisteína-peptidasas (mediante el mecanismo de alquilación de los residuos catalíticos de la cisteína), en bicarbonato amónico. Finalmente, las muestras fueron digeridas con 12.5 ng/µl de tripsina (*Promega*®) en 25 mM de bicarbonato de amonio (pH 8.5) a 37 °C durante toda la noche.

La tripsina utilizada es una enzima peptidasa de origen porcino, modificada mediante metilación, que hidroliza específicamente los enlaces peptídicos del extremo carboxilo de los residuos lisina (Lys) y arginina (Arg). Su actividad máxima se establece a un pH entre 7 y 9 y se inactiva de forma reversible a un pH de 4.

Tras la digestión, los péptidos se extrajeron del gel mediante una solución de 100 mmol/l de bicarbonato amónico (NH_4HCO_3). Estos extractos se liofilizaron y resuspendieron en ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1%. Los péptidos se purificaron usando puntas mmol-18 Zip (*Millipore*, Billerica, Mass). Para la espectrometría de masas se mezcló 1 μl de los extractos purificados con 1 μl de matriz de α -ciano 4-hidroxi-trans-cinámico (*Sigma*) en acetonitrilo (CH_3CN) al 50%. Un microlitro de esta mezcla se cargó en una placa de MALDI (*Pro MS MALDI Genomic Solutions*) y se dejó secar al aire a temperatura ambiente.

Los espectrómetros de masas utilizados en el análisis de proteínas o péptidos pueden ser divididos básicamente en dos partes: la fuentes de iones y el detector. La fuente de ionización MALDI se asocia a un analizador de tiempo de vuelo (TOF-*Time of Flight*) en el que los iones se separan en función de su relación masa/carga tras ser acelerados en un campo eléctrico o a un analizador TOF/TOF que proporciona un mejor enfoque de los iones y, por tanto, mayor resolución y precisión másicas. En el primer TOF los iones son acelerados a bajo voltaje, favoreciendo la fragmentación metaestable. Mediante un pulsador se selecciona un determinado ion padre y sus iones fragmento, que son acelerados a un potencial mayor y separados en el segundo TOF.

La espectrometría de masas se realizó utilizando el aparato 4700 *Proteomic Analyzer* (*Applied Biosystem*) y el análisis se efectuó en modo reflector positivo. Todos los espectros de masas se calibraron usando una mezcla de calibradores estándar (*Applied Biosystem*). Para el análisis automático de los datos de masa molecular se utilizó el 4000 *Series Explorer*

Software (*Applied Biosystems*) y los espectros obtenidos en modo MS/MS fueron combinados a través del *GPS Explorer Software* (*Applied Biosystems*).

Con el análisis en modo MS obtuvimos un espectro de masas denominado “huella peptídica” (Figura 4.4), y algunos de los péptidos observados se analizaron en modo MS/MS, como se ha publicado anteriormente ^{(120), (123), (124)}. El modo MS/MS obtiene espectros de fragmentación de las 3-5 masas mayoritarias dentro de cada una de las huellas peptídicas. Los péptidos con una relación señal-ruido mayor de 20 se consideraron en la Base de Datos *Mascot* (*MatrixScience*, UK) para la identificación de la proteína. Para llevar a cabo dicha identificación se utilizó la base de datos *Mascot* 1.9 (<http://www.matrixscience.com>) como algoritmo para comparar los péptidos obtenidos por espectrometría de masas.

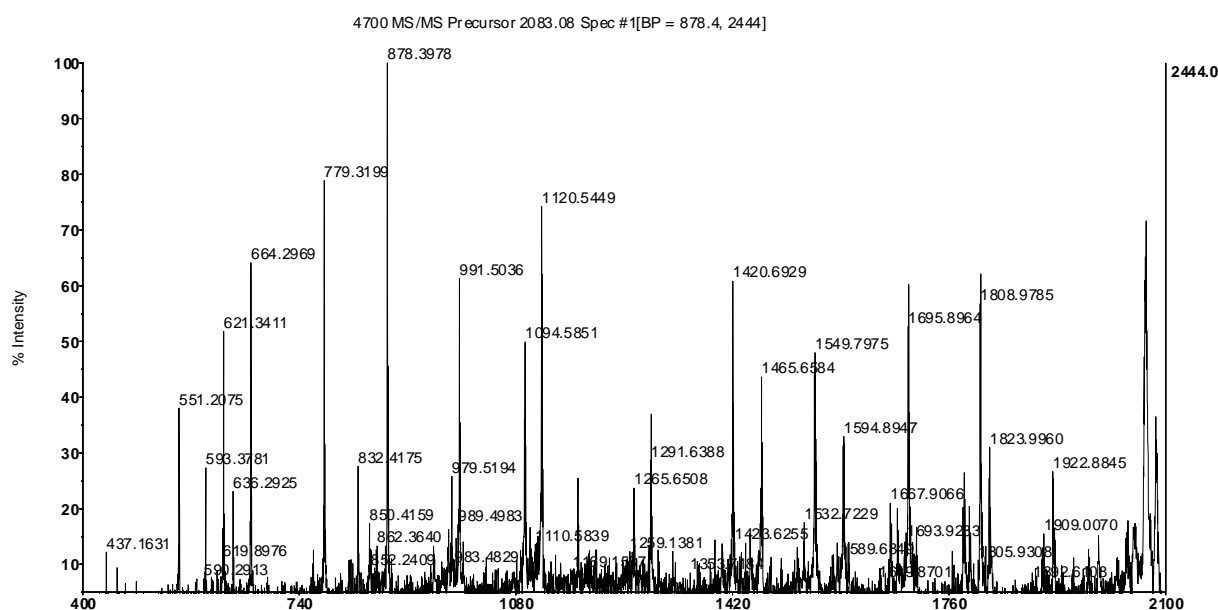


Figura 4.4: Ejemplo de espectro de masas moleculares. En este caso se trata de la huella peptídica de la anexina A2.

La base de datos *Mascot* (*MatrixScience*, UK) es una potente máquina de búsqueda para identificar proteínas de bases de datos primarias. Nos permite integrar todos los métodos de búsqueda probados: la huella peptídica o los fragmentos derivados del modo MS/MS.

Tras analizar la mezcla de péptidos mediante MS obtuvimos un conjunto de valores de masas moleculares que cruzamos con la base de datos Mascot. Para cada entrada en la base de datos de proteínas la máquina simula la rotura específica de los enlaces que se produce tras la digestión de las proteínas con la tripsina, calcula las masas de los péptidos previstos y compara el conjunto de valores de masas calculadas con los obtenidos de forma experimental. Para realizar la búsqueda, se introdujo el espectro y después de un corto período de tiempo, se recibieron los resultados.

IV.B.3. Western blot.

Se analizó mediante western blot (WB) la expresión del colágeno, la elastina y la proteína Bcl-2 tanto en las muestras de aorta aneurismática como en los controles de aorta sana, como se detalla a continuación.

El WB, o inmunoblot, es una técnica analítica utilizada para detectar determinadas proteínas específicas en una muestra concreta, como puede ser una mezcla compleja de proteínas (un extracto tisular). Mediante electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se prefiera: peso molecular, hidrofobicidad, estructura, etc. A continuación las proteínas son transferidas a una membrana adsorbente (normalmente de nitrocelulosa o de PVDF) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos

para ella. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática o fluorescencia, entre otros métodos. De esta forma se puede estudiar la presencia de la proteína en el extracto y analizar su cantidad relativa respecto a otras proteínas.

IV.B.3.1. Material utilizado.

- Papel de filtro.
- Tampón *Laemmli* (1x).
- SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfato PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) al 15%.
- PBS para lavado.
- Ácido Bicinconínico (BCA).
- Azul de Coomassie.
- Membrana de nitrocelulosa de polifluoruro de vinilideno (PVDF).
- Segmentos vasculares homogeneizados (muestras de aorta aneurismática y controles).
- Tampón TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween 20*)
- Anticuerpos primarios
 - ✦ Anti-Colágeno (COL1A (COL-1): sc-59772).
 - ✦ Anti-Elastina (elastin (A-19): sc-17580).

- ✦ Anti-Bcl-2 (Ab-1, #OP60).
- Anticuerpos secundarios
 - ✦ IgG anti-ratón (*General Electric Healthcare*®)
 - ✦ IgG anti-conejo (*Santa Cruz Biotechnology*®)
 - ✦ IgG anti-cabra (*General Electric Healthcare*®)
- Peroxidasa de rábano (HRP, *horseradish peroxidase*).
- *Kit ECL plus* (*Amersham*, cod. RPN 2132)
- Marcadores de peso molecular (*Sigma*®-*Aldrich*, *St Louis*, MI, USA)

IV.B.3.2. Preparación de las muestras.

Los tejidos aórticos homogeneizados se solubilizaron en el tampón *Laemmli*, el cual contiene 2-mercaptoetanol. Este tampón está especialmente formulado para la preparación de muestras proteicas en los geles de poliacrilamida. La formulación de dicho tampón es la siguiente, con un pH de 6.8, aproximadamente:

- SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*).....4%
- Glicerol.....20%
- 2-mercaptoetanol.....10%
- Azul de bromofenol.....0.004%

- M Tris-HCl.....125 mM

El agente detergente SDS proporciona a todas las proteínas carga positiva en un intervalo regular, dando a cada proteína la misma carga negativa total. De esta forma es posible separar las proteínas por su tamaño y no por su carga. El SDS también desnaturaliza las proteínas y sus subunidades para ayudar a la separación en base al tamaño y no a la forma. Añadir glicerol en el tampón incrementa la densidad del mismo, de forma que la muestra desciende hasta el fondo. Se minimizan así las pérdidas de proteína en el tampón. El 2-mercaptoetanol se usa para reducir los enlaces disulfuro intra e intermoleculares y permitir una adecuada separación en base a la forma y no por el tamaño. A su vez, el azul de bromofenol sirve como indicador de la muestra de proteínas, permitiendo su visualización de manera fácil. El Tris, que es un componente habitual de los tampones, representa la abreviación del compuesto orgánico conocido como tris(hidroximetil)aminometano, con la fórmula $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$. Posee una constante de disociación (pK_a) de 8.07 a 25 °C, lo que implica que dicho tampón va a tener una gran efectividad para mantener un determinado rango de pH y así se simulan las condiciones fisiológicas del ser humano.

IV.B.3.3. Electroforesis en gel.

Las proteínas se separaron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida o SDS-PAGE al 15% (w/v).

Fue cargada en cada pocillo la misma cantidad de proteína (20 µg/pocillo), calculado mediante la reacción colorimétrica basada en la reacción del BCA (esta reacción fue detallada con anterioridad, en el apartado **IV.B.1.3. Primera dimensión**). Para asegurarnos de que era cargada la misma cantidad de proteínas en el gel, se elaboró otro gel paralelo con muestras idénticas que posteriormente se tiñó con azul de Coomassie (colorante derivado del fenilmetano, $C_{47}H_{49}N_3NaO_7S_2$). La solución de tinción contenía los siguientes componentes:

- Azul de Coomassie.....0.5 g
- Metanol.....250 ml
- Ácido acético.....50 ml
- Agua destilada (hasta 500 ml).

Tras dos horas en contacto con la solución se procedió a desteñir la membrana con ácido acético y metanol.

IV.B.3.4. Transferencia y bloqueo de las proteínas.

La transferencia de proteínas o *blotting* consiste en la inmovilización sobre membranas sintéticas de dichas proteínas para, a continuación, identificarlas mediante sistemas de tinción. En la técnica WB, después de la separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, se transfieren a

una membrana mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel.

Cualquier procedimiento de *blotting* consta de 5 fases:

1. Inmovilización de las proteínas sobre la membrana, ya sea mediante transferencia (electroforética, aspiración, presión...) o mediante aplicación directa.
2. Saturación de todos los lugares de unión de proteínas de la membrana no ocupados para evitar la unión no específica de anticuerpos (que a su vez, son proteínas).
3. Incubación del *blot* con anticuerpos primarios contra la/s proteína/s de interés.
4. Incubación del *blot* con anticuerpos secundarios, o reactivos, que actúan de ligando del anticuerpo primario unidos a enzimas u otros marcadores.
5. Incubación con los sustratos apropiados en aquellas bandas de proteínas marcadas con enzimas para formar productos coloreados insolubles en el lugar donde se encuentran las bandas de proteína.

El trabajo con proteínas fijadas sobre una membrana, en lugar de gel, comporta una serie de ventajas: se tiñen y destiñen más rápidamente, es posible identificar cantidades menores de proteínas (dado que se concentran en la superficie) y no se diluyen en todo el espesor del gel. Además, es más fácil manipular las membranas que el propio gel.

Las proteínas fueron transferidas por electrotransferencia semihúmeda desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (*Immobilion*®-P, *Millipore*), para lo que se utilizó un tampón de transferencia (250 mM de glicina, 15% de metanol, 25 mM de Tris y agua destilada). Las membranas de tipo *Immobilion*®-P tienen una gran adsorción a las proteínas, de modo que se evita la pérdida de las mismas durante la transferencia. Tienen una estructura de poro abierto, lo cual facilita el acceso a las proteínas unidas o eliminar las que no lo han hecho. Los poros tienen un diámetro de 0.45 μm , lo que les hace aptos para ser utilizados en la mayoría de los WB, especialmente para proteínas de $> 20 \text{ kD}$ (Fig. 4.5).

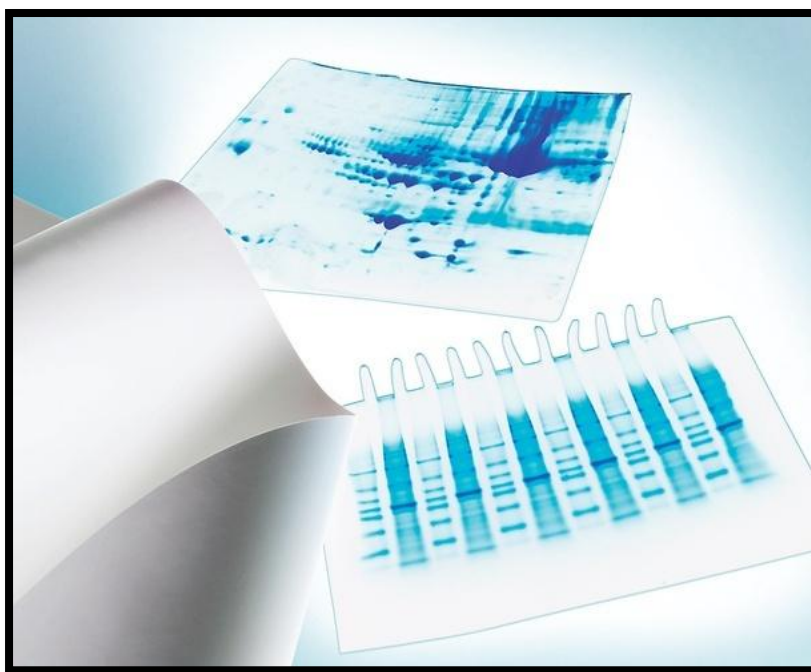


Figura 4.5: Ejemplo de membrana de nitrocelulosa utilizada para *Western Blot*. (fuente: internet, www.millipore.com).

Las membranas de nitrocelulosa fueron sometidas a 20 V durante una hora. Posteriormente fueron lavadas con metanol seguido de un tampón neutro (PBS), depositándose sobre el papel de filtro.

Dado que las proteínas tienen que unirse a la membrana de forma inespecífica, dichas membranas fueron bloqueadas (es decir, los lugares de unión de la membrana que no se habían ocupado tras la transferencia fueron bloqueados) durante toda la noche a 4 °C con un 5% (w/v) de leche en polvo no grasa en TBS-T (*Tris-Buffered Saline Tween-20*). De no hacerlo, los anticuerpos que se utilizan en la detección de las proteínas de interés quedarían adheridos a la membrana de forma inespecífica (dado que son también proteínas), dificultando la distinción del complejo antígeno-anticuerpo que se forma con la proteína problema.

El TBS-T es un tampón utilizado para mantener el pH en un rango relativamente estrecho. La formulación utilizada fue la siguiente:

- Tris-HCl (pH 5.2).....20 mmol/l
- NaCl.....137 mmol/l
- Tween-20.....0.1%

Como se ha comentado con anterioridad, el Tris tiene una gran efectividad para mantener un determinado rango de pH y simular así las condiciones fisiológicas del animal o del cuerpo humano. Al añadir ácido clorhídrico (HCl) podemos ajustar el pH hasta 5.2. El NaCl proporciona una concentración de sal isotónica. El polisorbato 20 o monooleato de Polioxietileno

Sorbitan, conocido comercialmente como *Tween 20*, es un surfactante polisorbato cuya estabilidad y relativa ausencia de toxicidad permiten que sea utilizado como detergente y emulsionante. Se utiliza para evitar las uniones no específicas de los anticuerpos, reduciendo así el ruido de fondo y los falsos positivos.

IV.B.3.5. Detección de proteínas.

Tras el bloqueo, se incubaron las membranas durante 12 horas a 4° C con anticuerpos monoclonales específicos para las proteínas que se pretendían cuantificar. Las proteínas de interés y los anticuerpos (Santa Cruz *Biotechnology*®, CA, EEUU) utilizados se resumen en la Tabla 4.5.

PROTEÍNA	ANTICUERPO
Colágeno	COL1A (COL-1): sc-59772
Elastina	Elastin (A-19): sc-17580
Bcl-2	Ab-1, #OP60

Tabla 4.5: Anticuerpos utilizados para la detección de las proteínas colágeno, elastina y

Las membranas se lavaron con PBS al 0.5% de *Tween* (tres veces durante 5 minutos) para eliminar el anticuerpo primario no unido y, después, fueron incubadas con anticuerpos secundarios durante una hora a temperatura ambiente, que reconocían de forma específica una región concreta del anticuerpo primario. Los anticuerpos secundarios fueron de origen animal: IgG

anti-ratón, anti-conejo o anti-cabra, conjugados con HRP (peroxidasa de rábano) a una dilución de 1:2000. Esta enzima, la HRP, en presencia de su sustrato, cataliza una reacción colorimétrica, haciendo patente la unión con el antígeno (la proteína) y su localización.

IV.B.3.6. Análisis.

Las proteínas se detectaron por quimioluminiscencia mejorada y se evaluaron por densitometría ⁽¹²⁶⁾. Para la detección de proteínas por quimioluminiscencia se utilizó el sistema ECL®(*Amersham Biosciences*), previo lavado con PBS. Consiste en un sustrato *Lumigen*® PS-3 que es convertido en un éster de acridinio cuando es catalizado por la peroxidasa de rábano (HRP). El éster reacciona con el peróxido en condiciones alcalinas y emite luz. El kit incluye la Solución A (sustrato que contiene el tampón Tris) y la Solución B (sustrato del acridinio con dioxano y etanol). Las dos soluciones se mezclan en una proporción 40:1. Inmediatamente después de la oxidación se leyó a 428 nm, con un máximo de emisión entre 15 y 20 minutos después de iniciada la reacción.

Para la quimioluminiscencia incubaron las membranas con el sustrato (ECL o luminol), para la posterior emisión de luminiscencia al ser expuesto al reporter que trae unido el anticuerpo secundario. La luz emitida fue captada por una cámara CCD, que tomó una imagen digital del WB.

La imagen se analizó por densitometría para evaluar la cantidad relativa de mancha y cuantificar el resultado en términos de densidad óptica (*Quantity One*®, Laboratorios *Bio-Rad*). Dicho software permite la adquisición,

cuantificación y análisis de gran variedad de datos, incluyendo muestras teñidas adquiridas mediante sistemas de geles. Las imágenes fueron configuradas, marcadas y, posteriormente, editadas.

Se utilizaron marcadores de peso molecular (*Sigma®-Aldrich, St Louis, MI, USA*) para el cálculo de la masa molecular, para monitorizar el progreso en la electroforesis y como control positivo para el análisis. Existe una gran variedad de marcadores de peso molecular para numerosas proteínas. En nuestro experimento utilizamos marcadores preteñidos, que contenían una mezcla liofilizada de proteínas con un rango de peso molecular entre 10.000 y 250.000 Da.

IV.B.4. ELISA.

Los niveles de expresión de la proteína Caspasa-3 fueron determinados mediante técnica ELISA (*Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay*).

La técnica ELISA se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que, de forma directa o indirecta, producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente. Para amplificar la señal se han desarrollado distintos métodos (luminiscentes, cascadas enzimáticas...) que han permitido elevar la sensibilidad de algunos ELISA y equipararla a la sensibilidad obtenida en el RIA (radioinmunoensayo hormonal).

Después de ensayar numerosas fases sólidas se ha llegado a las actuales microplacas de 96 pocillos de plástico tratado para aumentar su capacidad de absorción de moléculas y con fondos de pocillo ópticamente claros para poder realizar las medidas de densidad óptica en instrumentos específicos, espectrofotómetros de lectura de placas que se denominan lectores ELISA. Estos lectores son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa ELISA. Los lectores de ELISA disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda, aquellas que se corresponden con las necesarias para determinar la densidad óptica (D.O.) de los cromógenos más comúnmente utilizados.

Un ensayo ELISA consta de 4 fases:

1. Conjugación del anticuerpo o del antígeno con un enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina...).
2. Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos, gracias a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas.
3. Formación de una o más capas de inmunocomplejos. En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti-primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el ELISA *sandwich* es el pocillo el que se recubre con un primer

anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra en la que se encuentra el antígeno, que será retenido. A continuación se realiza un segundo lavado y se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

4. Revelado de la reacción enzimática. Después de lavar para eliminar las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato enzimático en solución. Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica mediante espectrofotometría.

El kit empleado para detectar Caspasa-3 (*Quantikine®*, *R&D Systems Europe*, número de catálogo KM300, Ltd. Abingdon UK) tiene un nivel de sensibilidad de 0.1 ng/ml, y los coeficientes de variación inter e intraensayo son 6.2% y 4.2% respectivamente.

Este kit se basa en un formato ELISA “sandwich”, con dos anticuerpos. Antes de ser cargadas en los pocillos, se añade a las muestras biotina-ZVKD-fmk 5 mM. Se trata de un inhibidor de la caspasa biotinilado, que modifica covalentemente la subunidad grande de la caspasa-3, formando uniones estables tio-éter con la cisteína en el sitio activo de la caspasa, a diferencia de los sitios inactivos, donde el inhibidor no se une. Tras lavar para eliminar las sustancias no unidas, los estándares y las muestras son pipeteadas en los pocillos precargados con anticuerpo anti-caspasa-3, de modo que la caspasa-3 presente en las muestras se une al anticuerpo inmovilizado.

Posteriormente se lava de nuevo, y se añade estreptavidina conjugada con HRP, la cual se une a la biotina presente en el inhibidor. Se añade después una solución con el sustrato de la peroxidasa, de forma que la reacción química catalizada por la peroxidasa crea un producto de color azul, que se detecta por espectrofotometría. La concentración de caspasa en las muestras se calcula por extrapolación de la curva de concentración estándar.

IV.B.4.1. Material utilizado.

El kit contiene:

- Placa con 96 pocillos (12 x 8) precargados con anticuerpo monoclonal de ratón específico para Caspasa-3
- Concentrado de conjugado: solución de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano (HRP)
- Diluyente del conjugado: 12.5 ml de solución tampón para dilución del concentrado de estreptavidina.
- Estándar de caspasa-3 activa: 40 ng de caspasa-3 liofilizada, derivada con un inhibidor biotinilado en una base proteica tamponada.
- Concentrado de diluyente del calibrador: 21 ml de solución proteica tamponada y concentrada.
- Concentrado de tampón de extracción: 21 ml de solución proteica tamponada y concentrada, que contiene surfactantes.

- 400 µg de inhibidor liofilizado y biotinilado ZVKD-fmk.
- Concentrado de tampón de lavado: 21 ml de solución concentrada de surfactante tamponado.
- Reactivo de color A: 12.5 ml de peróxido de hidrógeno estabilizado.
- Reactivo de color B: 12.5 ml de cromógeno estabilizado (tetrametilbenzidina).
- Solución de parada: 23 ml de ácido clorhídrico diluido.
- 4 selladores adhesivos.

IV.B.4.2. Preparación del material del ensayo.

a) Preparación de las muestras.

Se homogeneizaron las muestras en un tampón que contenía en concentración final 50 mM Tris- HCl, pH 7.5, cloruro sódico 75 mM, 1 mM fenilmetil sulfonil fluoruro (PMSF) usando 1 ml de tampón por 50 mg de tejido. Se centrifugó a 10000 rpm a 4°C durante 20 min, tomándose el sobrenadante.

b) Preparación de los reactantes.

Para su preparación, los reactantes primeramente debían equilibrarse a una temperatura de 20-25 °C antes de su preparación. Las soluciones tampón se mantenían la noche

previa a su uso a 2-8 °C. Se empleó agua destilada para la reconstitución de los reactantes

- Diluyente del calibrador: para preparar 100 ml de diluyente del calibrador, añadir a 20 ml del diluyente otros 80 ml de agua destilada.
- Solución de estreptavidina conjugada (concentrado de conjugado): para preparar suficiente conjugado para toda la placa, añadir 0.5 ml de concentrado de conjugado a 11 ml de diluyente de conjugado en un recipiente estéril.
- Tampón de lavado: si se han formado cristales en el concentrado, calentar a temperatura ambiente y agitar suavemente hasta que los cristales se hayan disuelto completamente. Diluir 20 ml de tampón de lavado concentrado para preparar 500 ml de tampón de lavado.
- Solución de sustrato: los reactivos de color A y B deben ser mezclados juntos en igual volumen a 15 minutos de su uso, requiriéndose 100 µl de la mezcla resultante.
- Inhibidor biotinilado ZVKD-fmk: añadir 92 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) a los 400 µg de inhibidor, para conseguir una solución 5 mM.
- Estándar de caspasa-3 activa: reconstruir el estándar de caspasa-3 activa con 2 ml de diluyente del calibrador, lo que producirá una solución de 20 ng/ml. Dejar reposar 5 minutos.

- Tampón de extracción: para preparar 10 ml de tampón de extracción se añadieron 3.6 g de Urea a 2 ml de concentrado de tampón de extracción. Llevar el volumen final a 10 ml con agua destilada.
- Inhibidores de proteasa (no incluidas en el kit): preparar leupeptina y pepstatina de 25mg/ml en DMSO. Preparar aprotinina según es suplida por el vendedor. Preparar PMSF 100 mM en isopropanol.
- Inmediatamente antes de su uso, añadir los inhibidores de proteasa al tampón de extracción según la siguiente tabla (tabla 4.6):

Inhibidor de proteasa	Inhibidor de proteasa (µl) / Tampón de extracción (ml)
Leupeptina	1 µl/ml
Pepstatina	1 µl/ml
PMSF	1 µl/ml
Aprotinina	3 µg/ml

Tabla 4.6: diluciones de los inhibidores de la proteasa en tampón de extracción

c) Preparación de los estándares.

- Se marcaron 6 tubos para 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62 y 0.31 ng/ml.
- Se añadieron 500 µl de diluyente del calibrador en cada tubo.

- Se pipetearon 500 μ l de solución estándar de Caspasa-3 de 20 ng/ml en el tubo de 10 ng/ml, mezclando posteriormente.
- Se tomaron 500 μ l de este tubo de 10 ng/ml y se añadieron al tubo de 5 ng/ml, mezclando posteriormente.
- Se repitió esta operación con todos los tubos marcados.
- La solución estándar de Caspasa-3 sirvió como la mayor concentración estándar (20 ng/ml). El diluyente del calibrador sirvió como el estándar cero (0 ng/ml).

IV.B.4.3. Protocolo del ensayo.

- Una vez homogeneizadas las muestras tisulares, se añadieron 2 μ l de biotina-ZVKD-fmk 5 mM por cada ml de cultivo celular. Se incubaron las células con la biotina-ZVKD-fmk durante 1 hora.
- Se pipetearon 100 μ l de diluyente del calibrador en los pocillos blancos, a continuación se pipetearon 100 μ l de cada estándar en los pocillos adecuados y posteriormente 100 μ l de cada muestra. Tanto el estándar cero como las muestras estándar se colocaron en los pocillos por duplicado. Se cubrió la placa los adhesivos proporcionados en el kit y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.

- Se aspiraron y lavaron los pocillos 4 veces con tampón de lavado, retirando el volumen residual cuidadosamente; invertir la placa sobre toallas de papel para secar.
- A continuación se añadieron 100 µl de solución de estreptavidina conjugada a cada pocillo. Se cubrieron con una nueva tira adhesiva y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.
- Se repitió el proceso de lavado / aspiración descrito anteriormente.
- Se añadieron 100 µl de solución de sustrato a cada pocillo, incubándolos posteriormente durante 30 minutos a temperatura ambiente, protegiendo la placa de la luz.
- Se añadió 100 µl de solución de parada a cada pocillo. La placa fue suavemente punteada para asegurar la mezcla.
- Se determinó la densidad óptica de cada pocillo durante 30 minutos, utilizando un lector de placas a 450 nm de longitud de onda.

IV.B.4.4. Procesamiento de los datos.

Se calculó la densidad óptica media para cada grupo de pocillos duplicados. Los datos se representaron en una curva en la que la densidad óptica media se representa en eje (y) y los estándar en ng/ml se representan

en el eje (x). Los valores en ng/ml de las muestras se extrapolaron de la curva obtenida para las muestras estándar.

La curva estándar obtenida en el presente estudio se muestra en la figura 4.6:

CURVA	ABS
0,00	0,051
0,31	0,126
0,62	0,200
1,25	0,331
2,50	0,597
5,00	1,058
10,00	1,811
20,00	2,784

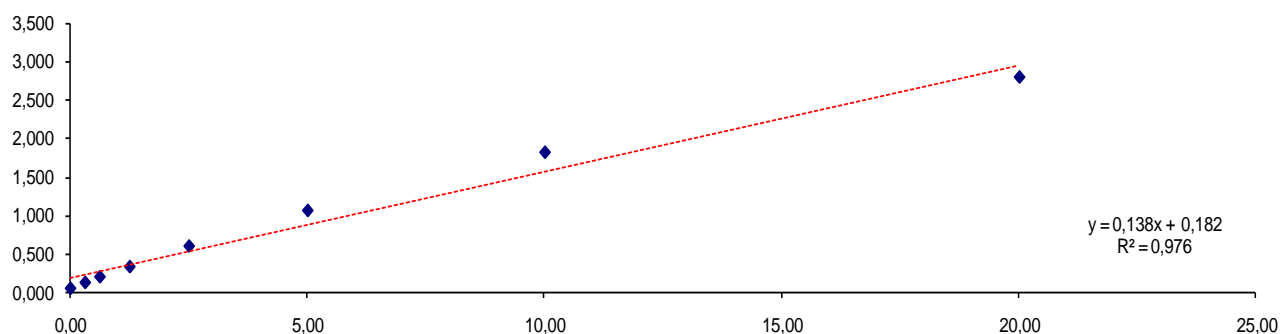


Figura 4.6: Datos de absorbancia (cuadro superior) y curva obtenida con las muestras estándar del kit de ELISA para Caspasa-3.

IV.C. Estudio estadístico.

Los resultados se han expresado como media \pm desviación estándar (DE). Para controlar el potencial sesgo relacionado con la edad, se realizó análisis de regresión lineal simple y multivariante.

El nivel de expresión de cada proteína ha sido considerado como una variable respuesta, y el estado del tejido aórtico (tejido aneurismático, AA=1; tejido sano, control=0) como una variable independiente. La edad se ha utilizado como una co-variable en el modelo multivariante.

El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS versión 16.0 (SPSS Inc., CA, USA). Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p \leq 0.05$.

V. RESULTADOS

V.A. Características basales de los pacientes y los controles.

Las características basales y la comorbilidad tanto de los pacientes intervenidos de AAA como de los controles (donantes de órganos por TCE severo) se exponen en la siguiente tabla (Tabla 5.1).

Parámetros	AAA (n=13)	Controles (n=12)	p
Edad (en años)	69.31 ± 4.38	53.91 ± 8.30	0.001
Sexo (hombres/mujeres)	11/2	9/3	-
Tamaño del AAA (cm)	6.73 ± 0.4	<2	0.001
Presencia de trombo	13/13	-	-
Factores de riesgo CV			
Tabaquismo	12/13	10/12	-
Hipertensión	8/13	7/12	-
Dislipemia	7/13	8/12	-
Diabetes Mellitus	2/13	0/12	-

Tabla 5.1: Características basales y comorbilidad de los pacientes y controles del estudio.

No se han encontrado diferencias significativas entre los dos grupos de estudio en cuanto a sexo y presencia de factores de riesgo cardiovascular. Sí que hay diferencias en lo que se refiere al diámetro aórtico (como es lógico, el grupo de pacientes con AAA presenta un diámetro aórtico significativamente mayor que el grupo control, cuyas aortas son sanas y tienen un diámetro normal) y la presencia de trombo mural (ninguna de las aortas que provienen de los donantes de órganos presentaba trombo mural, a diferencia de la casi totalidad de los pacientes con AAA). La edad también es significativamente mayor en los pacientes con AAA que en el grupo control ($p < 0.001$).

Como se ha detallado en el apartado IV (*Material y métodos*), las muestras de tejido aórtico fueron lavadas y limpiadas con suero salino isotónico previo al procesamiento proteómico. El trombo mural de las muestras procedentes de pacientes con AAA fue retirado y dicho tejido no se procesó para el estudio.

Una vez obtenidos los mapas de expresión proteica, los puntos encontrados en el gel fueron analizados densitométricamente e identificados en base a la comparación con los mapas de expresión proteica de aorta ascendente humana, publicados previamente ⁽¹²⁷⁾. Aquellos puntos donde se encontraron diferencias entre los mapas de los pacientes con AAA y los mapas de los controles fueron posteriormente identificados por espectrometría de masas.

La presente tesis estudia las posibles diferencias de expresión de las proteínas estructurales (matriz extracelular y citoesqueleto) en la pared de la aorta aneurismática en comparación con el tejido aórtico sano. Aunque en los geles obtenidos mediante doble electroforesis se encuentran multitud de otras proteínas, nos hemos centrado en la identificación y cuantificación de dichas proteínas. En la siguiente figura puede observarse uno de los geles obtenidos en las muestras de tejido aórtico.

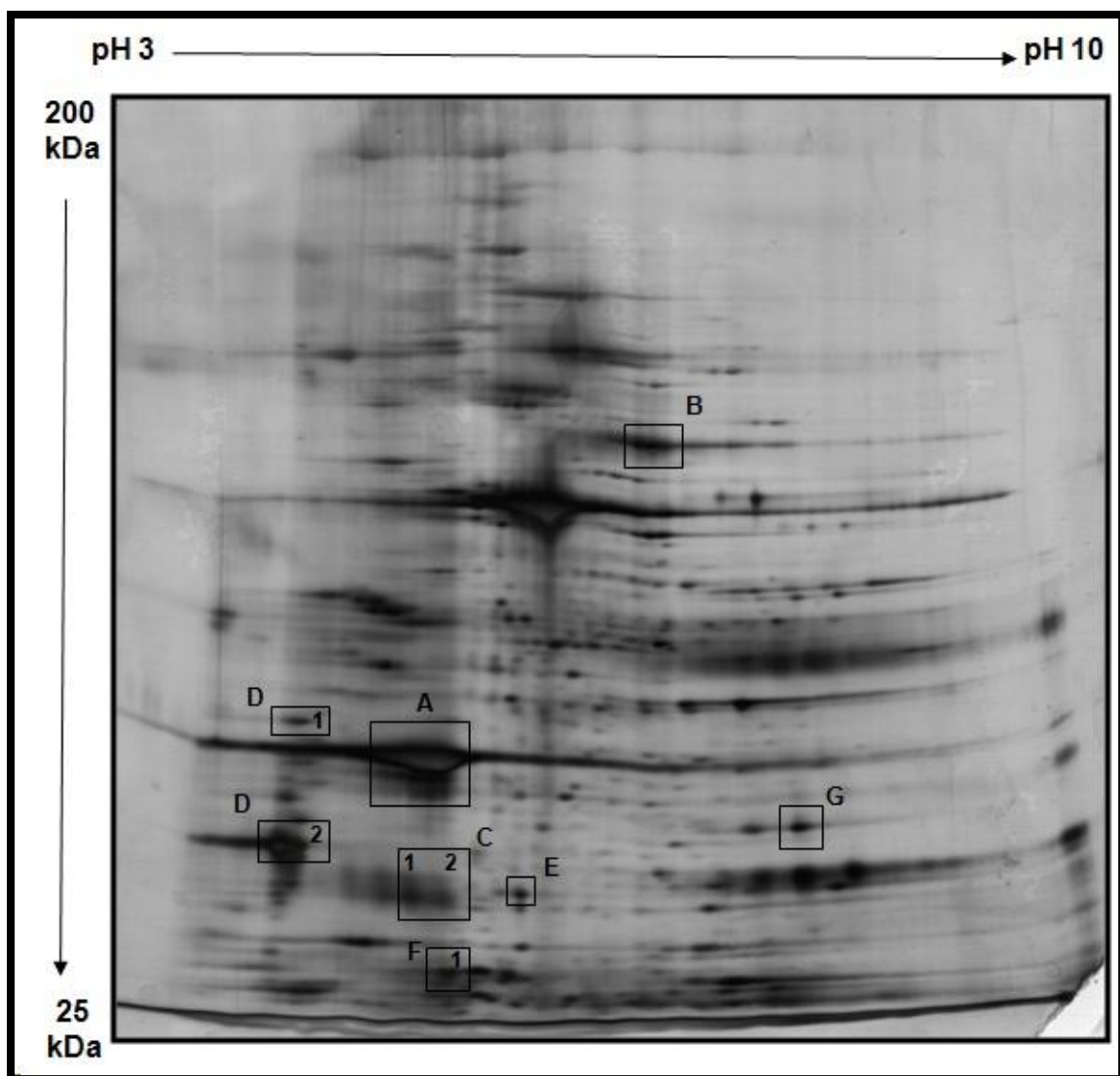


Figura 5.1: ejemplo de gel de doble electroforesis que muestra el mapa proteómico del tejido aórtico. En él se muestran las siguientes proteínas: A = γ/β Actina, B = Filamina, C = glicoproteína asociada a microfibrillas-4, D = cadena β de la tropomiosina, E = Vimentina, F = Anexina-A5, G=Anexina-A2. Los números muestran los diferentes isotipos proteicos.

V.B. Diferencias en las proteínas de la matriz extracelular.

De las principales proteínas que componen la matriz extracelular fueron estudiadas en los geles de doble electroforesis las siguientes:

- Colágeno.
- Elastina.

Al comparar los resultados obtenidos en las muestras de tejido aórtico sano con las muestras de tejido aórtico aneurismático, se ha observado una disminución significativa en los niveles de elastina en las muestras de pacientes con aneurisma de aorta abdominal. Se encontraron en general niveles menores de colágeno en las muestras de AAA respecto a los controles, aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística (Tabla 5.2).

Proteína	Controles (n=12)	AAA (n=13)	p ajustada a la edad
Colágeno	20809.50 ± 14908.86	3271.25 ± 2800.11	0.27
Elastina	31400.25 ± 15449.50	3934.25 ± 4463.40	0.04

Tabla 5.2: Niveles de expresión de las proteínas de la matriz extracelular en las muestras de aorta aneurismática (grupo AAA) y las muestras aórticas sanas (grupo control). Los niveles están expresados en Unidades Arbitrarias de Densitometría, y se exponen en forma de media ± desviación estándar (DE). La edad ha sido utilizada como co-variante en este modelo, de forma que los valores de p obtenidos están ajustados a la edad.

V.C. Diferencias en las proteínas asociadas con el citoesqueleto.

Las siguientes proteínas asociadas al citoesqueleto fueron identificadas en los geles tras la doble electroforesis:

- Actina- γ / β .
- Filamina.
- Glicoproteína asociada a microfibrillas - 4 (isotipo 1).
- Glicoproteína asociada a microfibrillas - 4 (isotipo 2).
- Cadena β de la tropomiosina (isotipo 1).
- Cadena β de la tropomiosina (isotipo 2).
- Vimentina.
- Anexina - A5 (isotipo 1).
- Anexina - A5 (isotipo 2).
- Anexina - A2.

En las muestras procedentes de pacientes con AAA se ha encontrado una reducción significativa en la expresión de las siguientes proteínas asociadas al citoesqueleto (en comparación con las mismas proteínas identificadas en las muestras de aorta sana):

- Glicoproteína asociada a microfibrillas - 4 (isotipo 1).
- Anexina A5 (isotipo 1).
- Anexina A2.

Asimismo, los niveles de expresión de filamina en el tejido aórtico aneurismático estaban aumentados respecto a los niveles encontrados en

aorta sana. En la siguiente tabla (Tabla 5.3) se resumen los niveles de expresión de las proteínas asociadas al citoesqueleto, tanto en AAA como en aorta sana:

Proteína	Controles (n=12)	AAA (n=13)	p ajustada a la edad
Actina- γ / β	2316.25 \pm 391.75	1113.31 \pm 210.04	0.499
Filamina	250.00 \pm 43.45	390.34 \pm 78.36	0.041
Glicoproteína asociada a microfibrillas - 4			
Isotipo 1	155.29 \pm 44.41	32.31 \pm 13.77	0.016
Isotipo 2	144.04 \pm 28.59	67.14 \pm 29.46	0.293
Cadena β de la tropomiosina			
Isotipo 1	206.90 \pm 86.35	171.14 \pm 72.82	0.145
Isotipo 2	837.72 \pm 180.97	240.86 \pm 44.06	0.217
Vimentina	141.09 \pm 12.27	83.45 \pm 16.09	0.175
Anexina A5			
Isotipo 1	430.66 \pm 40.51	259.75 \pm 33.1	0.012
Isotipo 2	149.86 \pm 26.83	132.49 \pm 23.80	0.401
Anexina A2	192.20 \pm 34.70	59.92 \pm 15.58	0.018

Tabla 5.3: Niveles de expresión de las proteínas del citoesqueleto en las muestras de aorta aneurismática (grupo AAA) y las muestras aórticas sanas (grupo control). Los niveles están expresados en Unidades Arbitrarias de Densitometría, y se exponen en forma de media \pm desviación estándar (DE). La edad ha sido utilizada como co-variante en este modelo, de forma que los valores de p obtenidos están ajustados a la edad.

V.D. Diferencias en proteínas relacionadas con la apoptosis celular.

Respecto a las proteínas estudiadas que intervienen en los mecanismos de apoptosis celular, se identificaron las siguientes proteínas.

- Bcl-2.
- Caspasa 3

Se han observado niveles aumentados de caspasa-3 en las muestras de tejido aórtico aneurismático con respecto a las muestras de aorta sana, diferencia que no alcanza la significación estadística (expresadas en Unidades Densitométricas Arbitrarias (UA); AAA: 216,55 ng/ml/mg \pm 327,95; control: 77,55 ng/ml/mg \pm 16,90; p ajustada a la edad = 0,51). También se ha observado un aumento de los niveles de expresión de la proteína Bcl-2 en las muestras de AAA respecto a los controles, pero sin alcanzar igualmente la significación estadística (expresadas en Unidades Densitométricas Arbitrarias (UA); AAA: 8125,25 UAD \pm 2744,22; control: 4826,00 UAD \pm 1647,00; p ajustada a la edad = 0,66).

VI. DISCUSIÓN

El objetivo principal de esta tesis consistía en estudiar las proteínas estructurales más importantes de la pared aórtica aneurismática a partir del mapa proteómico de la misma, y compararlo con las proteínas estructurales que componen la aorta sana. A la vista de los resultados obtenidos se ha observado que existen diferencias significativas en los niveles de determinadas proteínas entre ambos tipos de muestras. También se han encontrado diferencias en los niveles de determinadas proteínas implicadas en los mecanismos de apoptosis celular, la caspasa-3 y la proteína Bcl-2.

La etiopatogenia de los aneurismas de aorta abdominal todavía no se conoce con exactitud. Cada vez más investigadores creen que la aterosclerosis no es el desencadenante principal del desarrollo de la patología aneurismática, sino que están implicados mecanismos genéticos, mecánicos, inflamatorios e incluso autoinmunes ^{(31), (42), (54)}. Asimismo, y con la misma intención de arrojar más luz sobre la etiopatogenia de esta enfermedad, se han publicado varios trabajos sobre el estudio proteómico de los aneurismas de aorta abdominal.

VI.A. Estudios previos de proteómica en AAA.

Son pocos los trabajos que han analizado mediante proteómica la pared aórtica aneurismática. El primer artículo publicado que lo hizo fue el trabajo de Urbonavicius et al ⁽¹²⁸⁾ en 2009.

VI.A.1. Urbonavicius et al, 2009 ⁽¹²⁸⁾.

En este trabajo se estudiaron y compararon los mapas proteómicos de 17 muestras de tejido aórtico aneurismático, 9 de ellas obtenidas durante la reparación electiva de pacientes con aneurisma de aorta abdominal (no rotos) y 8 obtenidas en pacientes intervenidos de forma urgente por aneurisma de aorta roto. Los métodos de obtención y preparación de las muestras fueron similares a los utilizados en el presente estudio. Al comparar los niveles de proteínas entre las muestras de aneurismas rotos y no rotos, encontraron diferencias significativas en los niveles de 7 de ellas, 4 con niveles aumentados en los aneurismas rotos, y las otras 3 presentaban niveles inferiores (los aneurismas no rotos se usaron como referencia).

De las 7 proteínas, 2 no pudieron ser identificadas con claridad. Las 5 proteínas restantes se identificaron como:

- Proteínas aumentadas en los aneurismas rotos: Peroxiredoxina-2 y β -actina (las otras dos proteínas que se encontraban aumentadas en las muestras de aneurisma roto no se pudieron identificar)
- Proteínas disminuidas en los aneurismas rotos: Albúmina, γ -Actina de músculo liso y Vitronectina.

Las peroxiredoxinas son una familia de proteínas antioxidativas capaces de eliminar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) gracias a un residuo de Cisteína que comparten en la región N-terminal ⁽¹²⁹⁾. Estas proteínas se han implicado en la defensa celular frente a factores pro-oxidantes y en la regulación de varios procesos intracelulares tales como la proliferación, diferenciación y apoptosis ^{(129), (130)}. Una sobreexpresión del gen de las peroxiredoxinas confiere a la célula resistencia a niveles elevados de H_2O_2 .

El papel de las especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) y los antioxidantes en la génesis de los aneurismas de aorta es un área de gran interés en el momento actual. Se han identificado niveles elevados de iones superóxido (O_2^-) en el tejido aórtico aneurismático, en comparación con el tejido de aorta sana adyacente (2.5 veces inferior) y con muestras control de tejido aórtico sano (10 veces inferior) ⁽¹³¹⁾. Este ambiente pro-oxidante tiene importantes implicaciones en cuanto a degradación de la matriz extracelular y activación de las MMPs, de forma que es posible que el estrés oxidativo juegue un papel en la patogénesis de los aneurismas de aorta abdominal ^{(131), (132)}. Por lo tanto, según Urbonavicius et al ⁽¹²⁸⁾ el aumento de las peroxiredoxinas en las muestras de tejido aneurismático puede ser secundario a mecanismos específicos de respuesta al daño y estrés producido en los aneurismas rotos.

La actina, que también se ha encontrado en este trabajo aumentada en los aneurismas rotos, puede deberse al aumento de la actividad de degradación proteolítica durante la ruptura del aneurisma. La albúmina, sin

embargo, que se encuentra disminuida en las muestras de aneurisma roto, puede deber sus niveles a una dilución de sus moléculas debido al edema inflamatorio de la pared aórtica o a una degradación proteolítica aumentada (128).

La vitronectina, por su parte, es una glicoproteína multifuncional que puede encontrarse en el plasma sanguíneo y en la matriz extracelular, incluyendo la de la pared arterial. Participa en diversas funciones tales como migración, fijación y diferenciación celular, coagulación, fibrinólisis y complemento. Se cree que la actividad aumentada de las metaloproteasas en los aneurismas (sobre todo MMP-9, MMP-2 y MMP-12) puede ser la responsable de la degradación patológica de la vitronectina, explicando sus niveles bajos en las muestras de tejido de aneurisma aórtico roto (133).

VI.A.2. Urbonavicius et al, 2010 (134).

Un año más tarde, en 2010, el mismo autor publicó otro trabajo (134) en el que analizaba los mapas proteómicos de muestras de tejido aórtico aneurismático, relacionando los niveles de proteínas encontrados con el tamaño del aneurisma y su tasa de crecimiento, con la idea de buscar marcadores que pudiesen predecir la ruptura de un AAA y así identificar a los pacientes de riesgo.

Los autores encontraron seis puntos en el gel con correlación moderada con el tamaño de los aneurismas de los que procedían las muestras, de los cuales pudieron identificar un total de 3 proteínas: vitronectina (con trazas de calreticulina), albúmina y la proteína de unión a la Vitamina D (DBP),

las dos primeras con una correlación negativa (menor cantidad de proteína a mayor diámetro del aneurisma) y la última con correlación positiva.

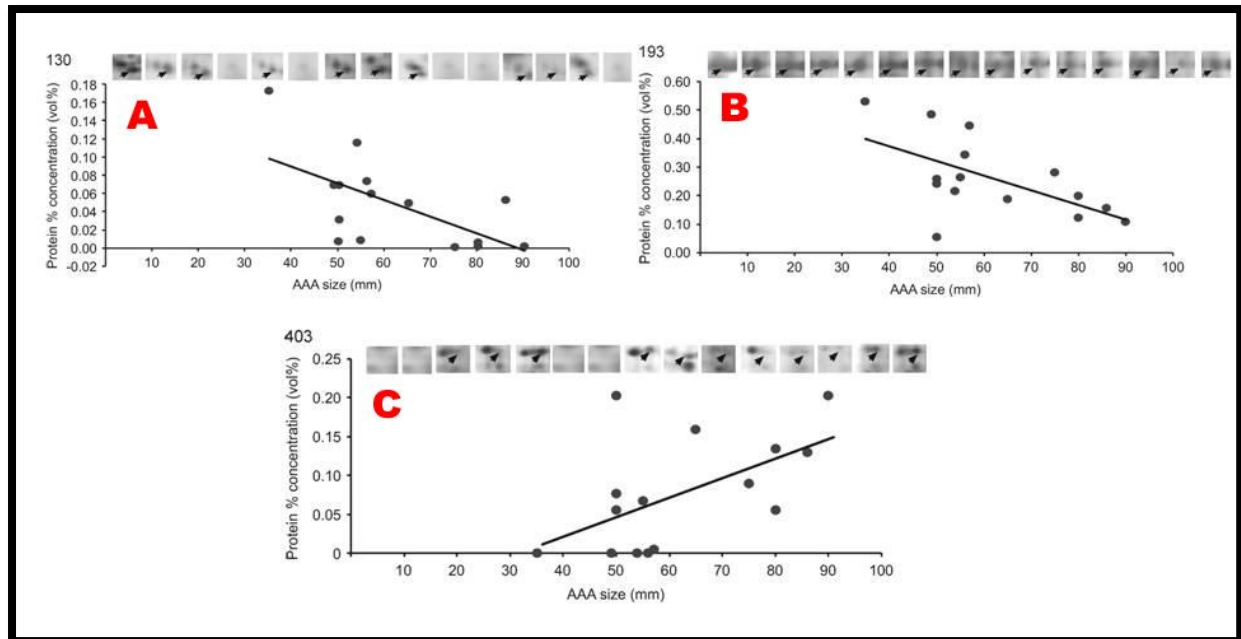


Figura 6.1: Correlación entre los niveles de las proteínas de la pared aórtica y el tamaño del aneurisma. A: Vitronectina, B: albúmina, C: proteína de unión a la Vitamina D. Tomado de: Urbonavicius S, Lindholt JS, Delbosc S, Urbonaviciene G, Henneberg EW, Vorum H, et al. Proteins associated with the size and expansion rate of the abdominal aortic aneurysm wall as identified by proteomic analysis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2010 Oct; 11(4): 433-41.

Respecto a la tasa de crecimiento de los aneurismas, se identificaron 16 puntos en los mapas proteómicos que guardaban una fuerte correlación con la tasa de crecimiento aneurismático, de los cuales 6 mostraban una correlación positiva, mientras que los 10 restantes tenían una correlación negativa. Los autores fueron capaces de identificar las proteínas correctamente en 9 de los 16 puntos:

- Proteínas identificadas con correlación positiva: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, anexina-A4, fragmento ig-h3 de la proteína inducida por TGF- β y el colágeno α -3(VI).

- Proteínas identificadas con correlación negativa: apolipoproteína H, cadena β del fibrinógeno, un fragmento de albúmina, inmunoglobulina α -1 y apolipoproteína A-I (con trazas de albúmina).

El aumento del fragmento ig-h3 de la proteína inducida por TGF- β hace pensar que la propia TGF- β pueda estar aumentada en los aneurismas. El TGF- β pertenece a familia de péptidos secretores multifuncionales, esencial en el desarrollo y remodelación vascular, con influencia en la proliferación de células musculares lisas, síntesis de matriz extracelular e inflamación intra-placa (135). Esta molécula aumenta la producción del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 y del inhibidor tisular de las metaloproteinasas (TIMP), disminuyendo por tanto la inflamación y la expresión de metaloproteinasas. El hecho de que se encuentre aumentado parece ser compensatorio, dada la aumentada actividad proteolítica que existe en los AAA. De todas formas, hay estudios que sugieren que la sobre-expresión de TGF- β 1 puede estar asociada al crecimiento de los AAA ⁽¹³⁶⁾.

No existe una clara explicación para la correlación negativa encontrada para la cadena β del fibrinógeno, si bien en la bibliografía se ha encontrado asociación positiva entre el tamaño del aneurisma y las concentraciones de fibrinógeno en plasma ⁽¹³⁷⁾. La vitronectina también presenta una correlación negativa con el tamaño del aneurisma, de acorde con los hallazgos encontrados en su anterior estudio ⁽¹²⁸⁾.

En estudios previos al que se está comentando ahora se ha encontrado asociación entre los niveles circulantes del propéptido amino-terminal del procolágeno tipo III con el tamaño y la tasa de crecimiento de los AAA ⁽¹³⁸⁾. En los mapas proteómicos se encontró una relación entre los niveles de fragmentos de colágeno α -3(VI) y el tamaño del aneurisma, así como con su tasa de expansión, lo cual está de acorde con las observaciones de estudios previos.

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa presenta también una correlación positiva con la tasa de crecimiento de los aneurismas, la cual se ha publicado que puede estar implicada en la iniciación de la apoptosis y el estrés oxidativo ⁽¹³⁹⁾, lo cual a su vez puede estar relacionado con la patogénesis de la enfermedad aneurismática ⁽¹³⁴⁾.

Los autores también encontraron correlación negativa entre la tasa de crecimiento de los aneurismas y los niveles de apolipoproteína H y apolipoproteína A-I. En consonancia con estos datos, se han publicado niveles bajos de colesterol HDL y apolipoproteína A-I en pacientes con AAA respecto a la población general ⁽¹⁴⁰⁾.

La proteína de unión a la Vitamina D (DBP) es el principal transportador de la vitamina D y sus metabolitos en plasma. Tiene importantes funciones fisiológicas como el almacenamiento y transporte de la Vitamina D, transporte de ácidos grasos, recogida de actina, activación y quimiotaxis de macrófagos, etc. También se ha visto que esta proteína está implicada en mecanismos de remodelación vascular, y puede contribuir al papel protector de los esteroides de Vitamina D en el desarrollo de enfermedades vasculares ⁽¹⁴¹⁾. Esto se

corresponde con los hallazgos en los geles de doble electroforesis, dado que se encontró una correlación positiva entre el tamaño de los aneurismas de aorta y los niveles de DBP. De todas maneras, y aunque la DBP era la proteína mayoritaria en el punto de migración del gel, se encontraron trazas de fragmentos de colágeno en el mismo punto, de forma que los investigadores no pudieron establecer cuál de las proteínas había variado en su expresión.

Por último, la presencia de inmunoglobulinas y albúmina en la pared aórtica aneurismática es concorde con el carácter inflamatorio de los aneurismas de aorta abdominal ⁽¹⁴²⁾.

VI.A.3. Ando et al, 2011 ⁽¹⁴³⁾.

En el año 2011 se publicó un trabajo ⁽¹⁴³⁾ en el que se estudiaba el mapa proteómico de tejido aórtico aneurismático, y se comparaba con tejido aórtico sano obtenido de los mismos pacientes, pero de regiones aórticas sanas. Las muestras se obtuvieron de tres pacientes que fueron intervenidos de forma programada por AAA.

Los autores encontraron, teniendo en cuenta los resultados de los geles de los tres pacientes, 495 puntos que se expresaban de forma diferente entre las muestras de aorta aneurismática y el tejido aórtico sano. De estos 495 puntos, sólo 22 puntos se encontraban en común en los tres pacientes, 19 con un nivel de expresión mayor en las muestras de aorta enferma, y 3 con un nivel de expresión proteica menor. De esos 22 puntos los autores sólo consiguieron identificar 3 proteínas, todas ellas aumentadas en la aorta aneurismática:

precursor del complemento C4-A, el precursor de la cadena α del fibrinógeno y el precursor de la cadena β del fibrinógeno.

Los investigadores dedujeron que los fragmentos de fibrinógeno encontrados, en base a los resultados del análisis proteómico y del estudio inmunohistoquímico ⁽¹⁴³⁾, se trataban de productos de degradación del fibrinógeno / fibrina, y por ende que la formación de fibrina y la fibrinólisis son fenómenos comunes en el desarrollo de la patología aneurismática.

El trombo mural se puede encontrar en cerca del 75% de los AAA ⁽¹⁴⁴⁾, el cual puede producir hipoxia de la capa media de la aorta, induciendo neovascularización e infiltración de la pared arterial por células inflamatorias ⁽¹⁴⁵⁾. Además, en los aneurismas de aorta se han descrito cambios histológicos (aterosclerosis y trombosis) en los *vasa vasorum* de la pared arterial ⁽¹⁴⁶⁾; de hecho, en propio estudio que se está comentando ahora, los propios autores encontraron estos cambios histológicos en las muestras de aorta aneurismática ⁽¹⁴³⁾. Teniendo todo esto en cuenta, incluso cuando no se detecte trombo mural en la pared de un aneurisma de aorta, la coagulación y fibrinólisis que ocurren comúnmente en la media puede dañar las células que componen dicha capa media, contribuyendo a la destrucción su estructura.

Tras encontrar aumentados los niveles del precursor de C-4A, los investigadores quisieron comprobar si el sistema del complemento se encontraba activado en los aneurismas, y para ello buscaron el depósito de C1q (dado que es el componente inicial de la vía clásica en la activación del complemento). En el análisis inmunohistoquímico encontraron depósito de C1q en todas las capas arteriales de las muestras aneurismáticas, mientras que no

lo encontraron en el tejido aórtico sano, por lo que el sistema del complemento se encuentra activado en las regiones de aorta aneurismática. Esto puede dañar a las células de la pared arterial, atacando a sus membranas plasmáticas y produciendo la lisis celular. Recientemente, se ha publicado que el reclutamiento de neutrófilos dependiente de complemento es un paso crítico para el desarrollo de ratones experimentales con AAA inducidos por elastasa⁽¹⁴⁷⁾.

VI.A.4. Molacek et al, 2014⁽¹⁴⁸⁾.

Por último, Molacek et al⁽¹⁴⁸⁾ han publicado recientemente sus resultados del estudio proteómico de muestras de tejido aórtico aneurismático. Junto con nuestro estudio constituyen los dos únicos trabajos que han analizado muestras de tejido aórtico aneurismático, comparándolas con muestras de tejido aórtico sano de pacientes sin AAA (donantes de órganos en parada cardiorrespiratoria). El trabajo de Ando et al⁽¹⁴³⁾ también analizó muestras de tejido aórtico sano, pero procedente de regiones aórticas no enfermas de los mismos pacientes de los que procedían las muestras de tejido aneurismático.

En este artículo se estudia la expresión proteómica de 15 muestras de aorta aneurismática y se compara con el de 10 muestras de tejido aórtico sano procedente de donantes de órganos. Los criterios de inclusión y el protocolo de recogida de muestras fue similar al empleado por nosotros.

Se identificaron un total de 417 puntos en los geles, de los cuales 314 se expresaban tanto en las muestras de aorta aneurismática como en la aorta

sana, pero de forma diferencial. De los puntos con más volumen y mejor definidos se pudieron identificar un total de 22 proteínas:

- Proteínas aumentadas en los AAA: α -1-antitripsina, albúmina, colágeno α -2(VI), endoplasmina, fibrinógeno γ , inmunoglobulina α -2, inmunoglobulina γ -1, factor 17 de procesamiento de pre-mRNA y transferrina.
- Proteínas disminuidas en los AAA: Actina cardíaca- α , alcohol-deshidrogenasa 1B, anexina A-2, anexina A-5, proteína 1 rica en cisteína y glicina, destrina, enolasa- α , gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, proteína de choque térmico de 70 kDa, keratina (tipo II, citoesqueleto 1), transgelina, proteína-glutamina γ -glutamyltransferasa 2 y vimentina.

En este artículo, a diferencia de los estudios previos de proteómica de AAA, los autores no realizaron una interpretación de los resultados obtenidos, dada la cantidad de proteínas con una expresión diferencial que encontraron.

VI.B. Expresión diferencial de proteínas en aorta sana y aorta aneurismática.

VI.B.1. Proteínas de la matriz extracelular.

En nuestro estudio se ha encontrado una tendencia a presentar niveles más bajos de expresión del colágeno en las muestras de tejido aórtico

aneurismático, en comparación con las muestras de tejido aórtico sano, diferencia que no ha alcanzado la significación estadística. Previamente se han publicado varios trabajos que estudiaban los cambios en el colágeno en los aneurismas de aorta abdominal, con resultados contradictorios. En ninguno de esos trabajos se realizó un estudio proteómico de muestras de tejido aneurismático.

En algunos de estos estudios la concentración de colágeno en los aneurismas de aorta abdominal se encontraba aumentada. Menashi et al ⁽¹⁴⁹⁾ estudiaron en 1987 la diferencia en la concentración de colágeno en muestras de aorta sana y aorta aneurismática, obtenidas de autopsias, encontrando que la concentración de colágeno era del 62% en la aorta sana, mientras que en la aorta aneurismática era del 84% ($62\% \pm 7\%$ vs $84\% \pm 6\%$, $p < 0.01$). Más tarde, Rizzo et al ⁽¹⁵⁰⁾, realizaron en 1989 un estudio en el que midieron la concentración de colágeno y elastina en 19 muestras de aorta aneurismática obtenida durante su reparación quirúrgica, y las compararon con las concentraciones de colágeno y elastina medidas en 13 muestras de aorta sana, procedente de autopsias. Los autores encontraron un aumento en la concentración de colágeno en las muestras de aorta aneurismática en comparación con la aorta sana ($37\% \pm 16\%$ en las muestras de AAA, frente a $24\% \pm 5\%$ en las aortas sanas, $p < 0.001$). En un estudio más reciente (He et al ⁽¹⁵¹⁾) los autores también publicaron que la fracción de volumen de colágeno aumentaba en un 77% en los aneurismas de aorta.

En otros trabajos, sin embargo, la concentración de colágeno en la aorta aneurismática era menor (Summer et al ⁽¹⁵²⁾), y en algunos no se

encontraron diferencias (McGee et al ⁽¹⁵³⁾, 27.8% \pm 4% en aorta sana, comparado con 34.7% \pm 2.3% en la aorta aneurismática).

En cuanto a la elastina, parece existir consenso en que la concentración de la misma en el tejido extracelular está reducida en los aneurismas de aorta abdominal, como publican la mayoría de trabajos que han estudiado este aspecto ^{(151), (152), (154), (155)}.

En los resultados de esta tesis se ha observado una disminución tanto de los niveles de colágeno como de elastina. Como he comentado con anterioridad, las publicaciones sobre la concentración de colágeno muestran resultados dispares, y ello puede ser debido a las diferencias metodológicas entre los diferentes trabajos ⁽¹⁵¹⁾. Los resultados de esta tesis en relación con la elastina concuerdan con lo publicado en la bibliografía. Las variaciones observadas en los niveles de estas dos proteínas se deben a que en la pared aneurismática se produce una degradación de la matriz extracelular, debido a un aumento de la actividad de determinadas metaloproteinasas, y incluyendo la actividad elastasa y colagenasa ^{(149), (156)}. Parece que una degradación preferente y en parte selectiva de la elastina en comparación con el colágeno pueda explicar la disminución consistente de los niveles de elastina y las variaciones en los niveles de colágenos publicados en la bibliografía.

VI.B.2. Proteínas asociadas con el citoesqueleto.

Cuando se observan los niveles de las distintas proteínas asociadas al citoesqueleto estudiadas en la presente tesis, salta a la vista que la mayoría de ellas (a excepción de la Filamina) presenta unos niveles menores en las

muestras de aorta aneurismática en comparación con la aorta sana, aunque sólo en 3 proteínas esta disminución alcanzó la significación estadística: isotipo 1 de la glicoproteína asociada a microfibrillas - 4, isotipo 1 de la anexina-A5 y la anexina-A2.

Se han publicado varios trabajos que demuestran la función de las anexinas como importantes reguladores del balance hemostático. Tanto la anexina-A5 como la anexina-A2 tienen propiedades antitrombóticas, e incluso, pueden reducir la cantidad de trombo formado, a través de la activación de la fibrinólisis ^{(88), (157)}. La disminución de la expresión de ambas anexinas puede favorecer, junto con otros factores ⁽¹⁵⁸⁾ (aumento de la expresión del factor temprano de respuesta al crecimiento-1 - Egr-1 -, aumento de la expresión y actividad del factor tisular, factores hemodinámicos, etc.) a la formación y aparición de trombo intraluminal en la pared de la aorta aneurismática, el cual se ha relacionado con la ruptura del AAA ⁽¹⁵⁹⁾.

Es interesante el hecho de que, a su vez, el mismo trombo mural puede ser un regulador de la expresión de proteínas en la pared arterial del AAA. En un trabajo ⁽¹⁶⁰⁾ en el que se coincubaron plasma humano rico en plaquetas con segmentos de aorta bovina preincubados con factor de necrosis- α , se observó que las plaquetas inducían una disminución de la expresión en la pared vascular, del isotipo 1 de la anexina-A5, entre otras proteínas. De este modo se da evidencia a una relación estrecha entre los componentes de la sangre periférica y la expresión en la pared vascular de anexinas.

Como se mencionó en la introducción, además de su papel en la coagulación, se ha relacionado a las anexinas con el fenómeno de la apoptosis

celular ⁽¹⁶¹⁾. Asimismo, se ha publicado y se está investigando en la actualidad sobre la relación entre la apoptosis y los aneurismas de aorta abdominal ⁽¹⁶²⁾.

Aunque la glicoproteína asociada a microfibrillas - 4 (junto con las anexinas) era la única proteína del sistema contráctil del citoesqueleto que mostraba una reducción significativa en su expresión en los aneurismas de aorta, el resto de proteínas del citoesqueleto también mostraron una tendencia a presentar unos niveles más bajos que los del tejido aórtico sano. Este hecho puede estar en consonancia con la disminución de la distensibilidad de la pared vascular en los aneurismas de aorta. El grupo de Makita et al ⁽¹⁶³⁾ demostraron una disminución de la distensibilidad vascular sistémica en pacientes con AAA, realizando mediciones de distensibilidad por Eco-Doppler en arterias alejadas de la aorta abdominal, como son las carótidas, y comparándolas con un grupo control sin AAA. Estos resultados sugieren que la disminución de la expresión de proteínas del citoesqueleto no sólo se produce en la pared vascular de la arteria afectada por el aneurisma, sino de forma sistémica en todo el árbol vascular.

El hecho de que la filamina, al contrario que el resto de proteínas del citoesqueleto, esté aumentada en los AAA, puede deberse a un mecanismo de compensación en respuesta a la pérdida de distensibilidad y contractilidad de la pared aneurismática. Las mutaciones en el gen de la filamina ocasionan distintas malformaciones, entre ellas malformaciones vasculares con pérdida de la distensibilidad vascular ⁽¹⁶⁴⁾. El hecho de que la expresión de filamina aumente en los AAA y otras proteínas del citoesqueleto estén reducidas, sugiere la especificidad de estas modificaciones.

VI.B.3. Proteínas relacionadas con la apoptosis celular.

El papel de la apoptosis celular en la patogenia y el desarrollo de los aneurismas de aorta abdominal no es del todo conocido. No obstante, existen numerosas publicaciones que relacionan el proceso de desarrollo aneurismático con un aumento de la actividad apoptótica en la pared vascular, fundamentalmente de macrófagos y células musculares lisas ⁽¹⁶⁵⁾. En modelos animales, la aplicación de CaPO_4 en la aorta infrarrenal de ratones acelera la formación de aneurismas en la aorta tratada, así como una potenciación de la apoptosis celular ⁽¹⁶⁶⁾. En otro modelo animal, el tratamiento con curcumina en ratones a los que se les había aplicado en la aorta torácica CaCl_2 (el cual hace desarrollar aneurismas de aorta en modelos animales), supuso la detención de la expansión de los aneurismas mediante el bloqueo de la kinasa de c-Jun N-terminal (JNK) ⁽¹⁶⁷⁾. Esta kinasa potencia la actividad de las metaloproteinasas de la matriz extracelular, y además juega un papel en la apoptosis de la pared vascular ⁽¹⁶⁸⁾.

En esta tesis se han encontrado aumentados en los aneurismas de aorta abdominal los niveles tanto de caspasa-3 (proteína proteasa que participa en el proceso de apoptosis) como de Bcl-2 (proteína perteneciente a la familia de proteínas Bcl-2, en este caso con actividad anti-apoptótica). Este aumento no alcanzó la significación estadística, sino que más bien los niveles de expresión de estas dos proteínas tienden a estar más elevados en las muestras de aorta aneurismática.

Es lógico pensar que el aumento de los niveles de caspasa-3 observados en el estudio se deben a la mayor actividad apoptótica que ocurre en los aneurismas de aorta abdominal. Un estudio inglés reciente ⁽¹⁶⁹⁾ cultivó células de musculo liso procedentes de tres localizaciones distintas: arterias de cerdo pretratadas con colagenasa y/o elastasa, tejido aórtico aneurismático humano procedente de la reparación electiva de pacientes con AAA y tejido venoso humano procedente de la vena safena interna de pacientes intervenidos de by pass coronario. Entre otras mediciones, se cuantificó la actividad Caspasa-3 en cada uno de los grupos. Tanto las arterias porcinas pretratadas con colagenasa / elastasa como las muestras de tejido aórtico aneurismático humano mostraron una actividad aumentada de caspasa-3 cuatro veces mayor que la de las células de músculo liso procedentes de safena interna.

Según nuestro conocimiento no existen trabajos que hayan cuantificado la expresión o la actividad de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 en los aneurismas de aorta abdominal, y los resultados de estudios parecidos son dispares. En un estudio realizado sobre aneurismas poplíteos ⁽¹⁷⁰⁾ se midió la actividad de determinadas proteínas implicadas en la apoptosis, comparándola con la encontrada en arterias poplíteas no aneurismáticas (procedentes de pacientes a los que se les realizó un by pass por isquemia de miembros inferiores). Los autores encontraron un aumento de expresión de moléculas pro-apoptóticas (Bax, Fas, perforina, etc.), pero no se encontraron diferencias en los niveles de Bcl-2.

En otro artículo, sin embargo, los niveles de Bcl-2 encontrados fueron inferiores a los controles. El grupo de Kadirvel et al ⁽¹⁷¹⁾ estudiaron un grupo de

20 conejos a los que se les provocó un aneurisma en la arteria carótida común utilizando el modelo de elastasa para conejos ⁽¹⁷²⁾. La arteria carótida contralateral, no modificada, fue usada como control. Los niveles de expresión de las moléculas anti-apoptóticas Bcl-2 y fosfo-Bad fueron significativamente menores en los aneurismas respecto a los controles a las 2 semanas, aunque las diferencias dejaban de ser significativas a las 12 semanas.

En esta tesis los niveles de Bcl-2 en la aorta aneurismática no presentaba diferencias significativas en comparación con las muestras de tejido de sano, aunque mostraban una tendencia a ser mayores en los AAA. Estos resultados podrían "coincidir" con los encontrados en la literatura, pero hay que tener en cuenta que los estudios que he mencionado versan sobre patología diferente (aneurismas de arteria poplítea y un modelo animal de aneurisma de arteria carótida), por lo que la comparación de los resultados hay que hacerla con mucha cautela. Serían necesarios más estudios específicos para arrojar luz sobre esta cuestión.

VI.C. Limitaciones del estudio.

Dado el diseño del presente estudio y los resultados obtenidos no es posible establecer una relevancia clínica aplicable en el momento actual. Especulando sobre los resultados, la disminución en la expresión de las proteínas de la matriz extracelular y el citoesqueleto puede estar relacionado con el grado de expansión de los aneurismas de aorta abdominal y su riesgo de ruptura. Los resultados del trabajo de Urbonavicius et al ⁽¹²⁸⁾, que muestran un nivel significativamente más bajo de vitronectina (otra proteína intracelular

relacionada con el citoesqueleto) en muestras de aneurismas rotos, apoya esta teoría.

Es importante destacar que en nuestro estudio no se puede discernir si los cambios de expresión proteicos observados se deben a una reducción real en la expresión proteica o a un aumento de los procesos proteolíticos inherentes al proceso aneurismático (ya se ha comentado en la presente tesis el papel que juegan las metaloproteinasas en la fisiopatología de los aneurismas de aorta). Sin embargo, la expresión de un gran número de proteínas no mostró cambios entre las muestras de aorta aneurismática y los controles sanos, por lo que (independientemente del mecanismo de control de la expresión proteica) los cambios encontrados en la expresión de proteínas parecen específicos del tejido aneurismático.

La edad constituye otra limitación en este estudio, y puede comportarse como un factor de confusión, dado que la edad media de los pacientes intervenidos de AAA es de 69, y la de los donantes de órganos 53. Para minimizar el impacto de esta diferencia de edad en el análisis estadístico se utilizó la edad como covariante en el modelo de regresión lineal.

El 38.5% (n=5) de los pacientes intervenidos por AAA se encontraban en tratamiento con estatinas en el momento de la cirugía. Se han publicado estudios que demuestran que el tratamiento con estatinas puede modificar la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis ⁽¹⁶²⁾. Aunque en este estudio las estatinas no modificaron los niveles de la proteína Bcl-2, sí disminuyeron los niveles de Bax (proteína pro-apoptótica), y por lo tanto disminuyó la relación Bax/Bcl-2. No podemos asegurar que los donantes de

órganos tomaran o no estatinas en el momento de la inclusión en el estudio. Sin embargo, los pacientes que tomaban estatinas y los que no las tomaban no mostraron diferencias en los niveles de expresión de las proteínas que sí muestran diferencias con los controles, de modo que el impacto del tratamiento con estatinas en el estudio es mínimo.

Tampoco se puede establecer, debido al diseño del estudio, de qué tipo celular dependen los cambios de expresión proteica observados en la pared de la aorta aneurismática. Serán necesarios estudios específicos para dilucidar esta cuestión.

VII. CONCLUSIONES

A la vista de los resultados obtenidos en los estudios proteómicos de las muestras de tejido aórtico aneurismático, en comparación con los hallados en los controles de aorta sana, y teniendo en cuenta la bibliografía existente sobre la etiopatogenia de los aneurismas de aorta abdominal, podemos establecer a las siguientes conclusiones:

1. En los aneurismas de aorta abdominal existe una disminución significativa en la expresión de elastina en comparación con el tejido aórtico sano. Aunque los niveles de expresión del colágeno también se encontraron disminuidos, la diferencia no alcanzó la significación estadística.
2. La mayoría de las proteínas del citoesqueleto se encuentran disminuidas en los aneurismas de aorta abdominal, aunque solamente hemos podido observar diferencias estadísticamente

significativas la glicoproteína asociada a microfibrillas - 4 (isotipo 1), anexina A5 (isotipo 1) y anexina A2.

3. Los niveles de filamina se encontraban significativamente aumentados en la aorta aneurismática en comparación con la aorta sana, probablemente secundaria a un mecanismo de compensación.
4. Los niveles de caspasa-3 y Bcl-2 se encontraron aumentados en los AAA, pero la diferencia no fue significativa. No se puede confirmar un aumento de actividad pro-apoptótica en los aneurismas de aorta abdominal.
5. Con nuestros resultados no es posible conocer si la apoptosis celular o el mismo proceso aneurismático son la causa de la disminución de la expresión de proteínas estructurales en la aorta aneurismática.
6. Dado que otras proteínas del citoesqueleto han mostrado niveles similares de expresión entre las arterias sanas y las provenientes de aneurismas, es probable que la reducción de la expresión de proteínas específicas del citoesqueleto en la pared

arterial aneurismática sea uno de los motivos de la progresión del crecimiento de la pared vascular dilatada.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Cronenwett JL, Wayne Johnston K. Rutherford's Vascular Surgery. 7th ed. Philadelphia (EEUU): Saunders Elsevier; 2010.
2. Johnston KW, Rutherford RB, Tilson MD, Shah DM, Hollier L, Stanley JC. Suggested standards for reporting on arterial aneurysms. Subcommittee on Reporting Standards for Arterial Aneurysms, Ad Hoc Committee on Reporting Standards, Society for Vascular Surgery and North American Chapter, International Society for CV Surgery. J Vasc Surg. 1991; 13(3):452-8.
3. Zarins CK, Glagov S, Vesselinovitch D, Wissler RW. Aneurysm formation in experimental atherosclerosis: relationship to plaque evolution. J Vasc Surg. 1990; 12(3):246-56.
4. Xu C, Zarins CK, Glagov S. Aneurysmal and occlusive atherosclerosis of the human abdominal aorta. J Vasc Surg. 2001; 33(1):91-6.
5. Ouriel K, Green RM, Donayre C, Shortell CK, Elliott J, DeWeese JA. An evaluation of new methods of expressing aortic aneurysms size: Relationship to rupture. J

- Vasc Surg. 1992; 15(1):12-18.
6. Blanchard JF. Epidemiology of abdominal aortic aneurysms. *Epidemiol Rev.* 1999; 21(2):207-21.
 7. LaMorte WW, Scott TE, Menzoian JO. Racial differences in the incidence of femoral bypass and abdominal aortic aneurysmectomy in Massachusetts: relationship to cardiovascular risk factors. *J Vasc Surg.* 1995; 21(3):422-31.
 8. Gillum RF. Epidemiology of aortic aneurysm in the United States. *J Clin Epidemiol.* 1995; 48(11):1289-98.
 9. Scott RA, Gudgeon AM, Ashton HA, Allen DR, Wilson NM. Surgical workload as a consequence of screening for abdominal aortic aneurysm. *Br J Surg.* 1994; 81(10):1440-2.
 10. Cosford PA, Leng GC. Screening for abdominal aortic aneurysm. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007; 18;(2):CD002945.
 11. Minino AM, Arias E, Kochanek KD, Murphy SL, Smith BL. Deaths: final data for 2000. *Natl Vital Stat Rep.* 2002; 50(15): 1-119.
 12. Bobadilla JL, Kent KC. Screening for abdominal aortic aneurysms. *Adv Surg.* 2012; 46(1):101-9.
 13. Baxter BT, McGee GS, Flinn WR, McCarthy WJ, Pearce WH, Yao JS. Distal embolization as a presenting symptom of aortic aneurysms. *Am J Surg.* 1990;

160(2): 197-201.

14. Bengtsson H, Bergqvist D. Ruptured abdominal aortic aneurysm: a population-based study. *J Vasc Surg.* 1993; 18(1):74-80.
15. Hallin A, Bergqvist D, Holmberg L. Literature review of surgical management of abdominal aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2001; 22(3): 197-204.
16. Lederle FA, Simel DL. The rational clinical examination. Does this patient have abdominal aortic aneurysm? *JAMA.* 1999; 281(1): 77-82.
17. Lynch RM. Accuracy of abdominal examination in the diagnosis of non-ruptured abdominal aortic aneurysm. *Accid Emerg Nurs.* 2004; 12(2): 99-107.
18. Jaakkola P, Hippeläinen M, Farin P, Rytönen H, Kainulainen S, Partanen K. Interobserver variability in measuring the dimensions of the abdominal aorta: comparison of ultrasound and computed tomography. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1996; 12(2): 230-7.
19. Grobner T. Gadolinium -- a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis? *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21(4): 1104-8.
20. Wyers MC, Fillinger MF, Schermerhorn ML, Powell RJ, Rzucidlo EM, Walsh DB, et al. Endovascular repair of abdominal aortic aneurysm without preoperative arteriography. *J Vasc Surg.* 2003; 38(4): 730-8.

21. Brady AR, Thompson RW, Greenhalgh RM. Cardiovascular risk factors and abdominal aortic aneurysm expansion: only smoking counts (Abstract). *Br J Surg*. 2003; 90(1):492.
22. Schewe CK, Schweikart HP, Hammel G, Spengel FA, Zöllner N, Zoller WG. Influence of selective management on the prognosis and the risk of rupture of abdominal aortic aneurysms. *Clin Investig*. 1994; 72(8): 585-91.
23. Wolf YG, Thomas WS, Brennan FJ, Goff WG, Sise MJ, Bernstein EF. Computed tomography scanning findings associated with rapid expansion of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg*. 1994; 20(4): 529-35.
24. Brewster DC, Cronenwett JL, Hallett JW, Johnston KW, Krupski WC, Matsumura JS, et al. Guidelines for the treatment of abdominal aortic aneurysms. Report of a subcommittee of the Joint Council of the American Association for Vascular Surgery and Society for Vascular Surgery. *J Vasc Surg*. 2003; 37(5): 1106-17.
25. Fillinger MF, Marra SP, Raghavan ML, Kennedy FE. Prediction of rupture risk in abdominal aortic aneurysm during observation: wall stress versus diameter. *J Vasc Surg*. 2003; 37(4): 724-32.
26. Parodi JC, Palmaz JC, Barone HD. Transfemoral intraluminal graft implantation for abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg*. 1991; 5(6):491-9.
27. Moll FL, Powell JT, Fraedrich G, Verzini F, Haulon S, Waltham M, et al. Management of abdominal aortic aneurysms clinical practice guidelines of the European society for vascular surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2011; 41 (Suppl

1):S1-S58.

28. Chaikof EL, Brewster DC, Dalman RL, Makaroun MS, Illig KA, Sicard GA, et al. The care of patients with an abdominal aortic aneurysm: the Society for Vascular Surgery practice guidelines. *J Vasc Surg.* 2009; 50(4 Suppl):S2-49.
29. Pasterkamp G, Schoneveld AH, van Wolferen W, Hillen B, Clarijs RJ, Haudenschild CC, et al. The impact of atherosclerotic arterial remodeling on percentage of luminal stenosis varies widely within the arterial system. A postmortem study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17(11): 3057-63.
30. Labropoulos N, Zarge J, Mansour MA, Kang SS, Baker WH. Compensatory arterial enlargement is a common pathobiologic response in early atherosclerosis. *Am J Surg.* 1998; 176(2): 140-3.
31. Wolinsky H, Glagov S. Comparison of abdominal and thoracic aortic medial structure in mammals. Deviation of man from the usual pattern. *Circ Res.* 1969; 25(6): 667-86.
32. Scherer PW. Flow in axisymmetrical glass model aneurysm. *J Biomech.* 1973; 6(6): 695-700.
33. Reed D, Reed C, Stemmermann G, Hayshahi T. Are aortic aneurysms caused by atherosclerosis? *Circulation.* 1992; 85(1): 205-11.
34. Forsdahl SH, Singh K, Solberg S, Jacobsen BK. Risk factors for abdominal aortic aneurysms: a 7-year prospective study: the Tromsø Study. *Circulation.* 2009;

119(16): 2202-8.

35. Tilson MD, Stansel HC. Differences in results for aneurysms vs occlusive disease after bifurcation grafts: results of 100 elective grafts. *Arch Surg.* 1980; 115(10): 1173-5.
36. Cannon DJ, Casteel L, Reed RC. Abdominal aortic aneurysm, Leryche's syndrome, inguinal herniation, and smoking. *Arch Surg.* 1984; 119(4): 387-9.
37. Lehnert B, Wadouh F. High coincidence of inguinal hernias and abdominal aortic aneurysms. *Ann Vasc Surg.* 1992; 6(2): 134-7.
38. Antoniou GA, Georgiadis GS, Antoniou SA, Granderath FA, Glannoukas AD, Lazarides MK. Abdominal aortic aneurysm and abdominal wall hernia as manifestations of a connective tissue disorder. *J Vasc Surg.* 2011; 54(4): 1175-81.
39. Bengtsson H, Bergqvist D, Sternby NH. Increasing prevalence of abdominal aortic aneurysms. A necropsy study. *Eur J Surg.* 1992; 158(1): 19-23.
40. Fowkes FG, Macintyre CC, Ruckley CV. Increasing incidence of aortic aneurysms in England and Wales. *BMJ.* 1989; 298(6665): 33-5.
41. Lederle FA, Johnson GR, Wilson SE, Chute EP, Littooy FN, Bandyk D, et al. Prevalence and associations of abdominal aortic aneurysm detected through screening. Aneurysm Detection and Management (ADAM) Veterans Affairs Cooperative Study Group. *Ann Intern Med.* 1997; 126(6): 441-9.

42. Koch AE, Haines GK, Rizzo RJ, Radosevich JA, Pope RM, Robinson PG, et al. Human abdominal aortic aneurysms. Immunophenotypic analysis suggesting an immune-mediated response. *Am J Pathol.* 1990; 137(5): 1199-213.
43. Moñux Ducajú G. Papel de la autoinmunidad en la génesis de los aneurismas de aorta abdominal. Estudio inmunogenético [tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2003. .
44. Evans CH, Georgescu HI, Lin CW, Mendelow D, Steed DL, Webster MW. Inducible synthesis of collagenase and other neutral metalloproteinases by cells of aortic origin. *J Surg Res.* 1991; 51(5): 399-404.
45. Saratzis A, Abbas AA, Kiskinis D, Melas N, Saratzis N, Kitas GD. Abdominal aortic aneurysm: a review of the genetic basis. *Angiology.* 2011; 62(1): 18-32.
46. Newman KM, Jean-Claude J, Li H, Scholes JV, Ogata Y, Nagase H, et al. Cellular localization of matrix metalloproteinases in the abdominal aortic aneurysm wall. *J Vasc Surg.* 1994; 20(5): 814-20.
47. Curci JA, Liao S, Huffman MD, Shapiro SD, Thomson RW. Expression and localization of macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) in abdominal aortic aneurysms. *J Clin Invest.* 1998; 102(11): 1900-10.
48. Goodall S, Crowther M, Hemingway DM, Bell PR, Thompson MM. Ubiquitous elevation of matrix metalloproteinase-2 expression in the vasculature of patients with abdominal aneurysms. *Circulation.* 2001; 104(3): 304-9.

49. Newman KM, Ogata Y, Malon AM, Irizarry E, Gandhi RH, Nagase H, et al.
Identification of matrix metalloproteinases 3 (streptomelisin) and 9 (gelatinase B) in abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb vasc biol.* 1994; 14(8): 1315-20.
50. Freestone T, Turner RJ, Coady A, Higman DJ, Greenhalgh RM, Powell JT.
Inflammation and matrix metalloproteinases in the enlarging abdominal aortic aneurysm. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15(8): 1145-51.
51. Newman KM, Jean-Claude J, Li H, Ramey WG, Tilson MD. Cytokines that activate proteolysis are increased in abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 1994; 90(5 Pt 2): 11224-7.
52. Hamano K, Li TS, Takahashi M, Kobayashi T, Shirasawa B, Ito H, et al. Enhanced tumor necrosis factor-alpha expression in small sized abdominal aortic aneurysms. *World J Surg.* 2003; 27(4): 476-80.
53. Schönbeck U, Sukhova GK, Gerdes N, Libby P. T(H)2 predominant immune responses prevail in human aortic aneurysm. *Am J Pathol.* 2002; 161(2): 499-506.
54. Geraghty PJ, Starcher BC, Borhani M, Thompson RW. Interleukin-10 deficiency potentiates aortic collagen and elastin degradation in elastase-induced murine aortic aneurysm formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21 (1):676.
55. Damiano V, Tsang A, Kucich U, Weinbaum G, Rosenbloom J. Immuno electron microscopic studies on cells synthesizing elastin. *Connect Tissue Res.* 1981; 8(3-

4):185-8.

56. Sims FH. The initiation of intimal thickening in human arteries. *Pathology*. 2000; 32(3):171-5.
57. Wagenseil JE, Mecham RP. Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiol Rev*. 2009; 89(3):957-89.
58. Garrido Pertierra A, Teijón Rivera JM, editors. *Fundamentos de bioquímica estructural* Madrid (España): Editorial Tébar S.L; 2006.
59. Kadler KE, Holmes DF, Trotter JA, Chapman JA. Collagen fibril formation. *Biochem J*. 1996; 316 (Pt 1): 1-11.
60. Gelse K, Pöschl E, Aigner T. Collagens - structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003; 55(12): 1531-46.
61. Fessler LI, Brosh S, Chapin S, Fessler JH. Tyrosine sulfation in precursors of collagen V. *J Biol Chem*. 1986; 261(11): 5034– 5040.
62. De Paz Lugo P. Estimulación de la síntesis de colágeno en cultivos celulares. Posible tratamiento de enfermedades degenerativas mediante la dieta [tesis]. Granada: Universidad de Granada; 2006. .
63. Ross R. The elastic fiber. *J Histochem Cytochem*. 1973; 21(3): 199-208.
64. Shapiro SD, Endicott SK, Province MA, Pierce JA, Campbell EJ. Marked longevity of human lung parenchymal elastic fibers deduced from prevalence of D-aspartate

- and nuclear weaponsrelated radiocarbon. *J Clin Invest.* 1991; 87(5): 1828–1834.
65. Starcher BC. Elastin and the lung. *Thorax.* 1986; 41(8): 577–585.
66. Ross MH, Pawlina W, editors. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular.* 5th ed. Buenos Aires (Argentina): Médica Panamericana; 2008.
67. Kielty CM, Baldock C, Lee D, Rock MJ, Ashworth JL, Shuttleworth CA. Fibrillin: from microfibril assembly to biomechanical function. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2002; 357(1418): 207-17.
68. Davis MR, Summers KM. Structure and function of the mammalian fibrillin gene family: implications for human connective tissue diseases. *Mol Genet Metab.* 2012; 107(4): 635-47.
69. Gibson MA. Microfibril-Associated Glycoprotein-1 (MAGP-1) and other non-fibrillin macromolecules wich may possess a functional association with the 10 nm microfibrils. In *Madame Curie Bioscience Database [Internet].* Austin (TX): Landes Bioscience; 2000.
70. Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. *Annu Rev Biophys.* 2011; 40(1): 169-186.
71. Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, Dedova IV, Tsubakihara M, Berry DA, et al. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev.* 2003; 83(2): 433-73.

72. Lodish H, et al, editors. Biología celular y molecular. 5th ed. Nueva York (EEUU): Medica Panamericana; 2005.
73. García E, Jay D. Filamina plaquetaria: una proteína del citoesqueleto integradora de la función celular. Arch Cardiol Mex. 2006; 76 (Suppl 4): S67-75.
74. Van der Flier A, Sonnenberg A. Structural and functional aspects of filamins. Biochim Biophys Acta. 2001; 1538(2-3): 99-117.
75. Stewart M. Structural basis for bending tropomyosin around the actin in muscle thin filaments. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98(15): 8165-6.
76. Perry SV. Vertebrate tropomyosin: distribution, properties and function. J Muscle Res Cell Motil. 2001; 22(1): 5-49.
77. Gámez Carbonell J. Contribución a la caracterización clínica y genética de la enfermedad de McArdle [tesis]. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona. ; 2002.
78. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B, Anadón R, et al., editors. Biología celular. 3rd ed. Madrid (España): McGraw-Hill - Interamericana de España; 2007.
79. Byun Y, Chen F, Chang R, Trivedi M, Green KJ, Cryns VL. Caspase cleavage of vimentin disrupts intermediate filaments and promotes apoptosis. Cell Death Differ. 2001; 8(5): 443-50.

80. Belichenko I, Morishima N, Separovic D. Caspase-resistant ximentin suppresses apoptosis after photodynamic treatment with a silicon phtalocyanine in Jurkat cells. *Arch Biochem Biophys*. 2001; 390(1): 57-63.
81. Liemann S, Lewit-Bentley A. Annexins: a novel family of calcium - and membrane - binding proteins in search of a function. *Structure*. 1995; 3(3): 233-7.
82. De Diego Martínez I. Distribución intracelular de la anexina A6: implicaciones funcionales [tesis]. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2005. .
83. Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev*. 2002; 82(2): 331-71.
84. Hayashi T, Morishita E, Ohtake H, Oda Y, Asakura H, Nakao S. Expression of annexin II in experimental abdominal aortic aneurysms. *Int J Hematol*. 2009; 90(3): 336-42.
85. Hayashi T, Morishita E, Ohtake H, Oda Y, Ohta K, Arahata M, et al. Expression of annexin II in human atherosclerotic abdominal aortic aneurysms. *Thromb Res*. 2008; 123(2): 274-80.
86. Van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schuttle B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 1998; 31(1): 1-9.
87. Sarda-Mantel L, Coutard M, Rouzet F, Raguin O, Vrigneaud JM, Hervatin F, et al. ^{99m}Tc-annexin-V functional imaging of luminal thrombus activity in abdominal

- aortic aneurysms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006; 26(9): 2153-9.
88. Galán AM, van Heerde WL, Escolar G, Ordinas A, Sixma J, de Groot PG.
Antithrombotic action of annexin V proved as efficient as direct inhibition of
tissue factor or thrombin. *Eur J Clin Invest.* 2006; 36(9): 633-9.
89. Reutelingsperger CP, Hornstra G, Hemker HC. Isolation and partial purification of
a novel anticoagulant from arteries of human umbilical cord. *Eur J Biochem.* 1985;
151(3): 625-9.
90. Dewson G, Kluck RM. Bcl-2 family-regulated apoptosis in health and disease. *Cell
Health and Cytoskeleton.* 2010; 2010(2): 9-22.
91. Perales Romero S. Proliferación y apoptosis en células de músculo liso arteriales
en cultivo [tesis]. Granada: Universidad de Granada; 2005. .
92. Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature.* 1997; 387(6635):
773-6.
93. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998; 281(5381): 1309-
12.
94. Kelekar A, Thompson CB. Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in
apoptosis. *Trends Cell Biol.* 1998; 8(8): 324-30.
95. Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, et al. Regulated
targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol.* 1998; 143(1): 207-15.

96. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, et al. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol.* 1999; 144(5): 903-14.
97. Hsu YT, Wolter KG, Youle RJ. Cytosol -to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94(8): 3668-72.
98. Puthalakath H, Huang DC, O'Reilly LA, King SM, Strasser A. The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. 1999; 3(3): 287-96.
99. Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem.* 1998; 273(10): 5841-5.
100. Ng FW, Nguyen M, Kwan T, Branton PE, Nicholson DW, Cromlish JA, et al. p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 1997; 139(2): 327-38.
101. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem.* 1975; 250(10): 4007-4021.
102. Garrels JI, Gibson W. Identification and characterization of multiple forms of actin. *Cell.* 1976; 9(4 PT 2): 793-805.
103. Anderson NG, Anderson NL. Twenty years of two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis.* 1996; 17(3): 443-53.

104. Bauw G, Van Damme J, Puype M, Vandekerckhove J, Gesser B, Ratz GP, et al. Protein-electroblotting and -microsequencing strategies in generating protein data bases from two-dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86(20): 7701-5.
105. Edman P. A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch Biochem*. 1949; 22(3): 475.
106. Zamorano-León JJ, Modrego J, Mateos-Cáceres PJ, Macaya C, Martín-Fernández B, Miana M, et al. A proteomic approach to determine changes in proteins involved in the myocardial metabolism in left ventricles of spontaneously hypertensive rats. *Cell Physiol Biochem*. 2010; 25(2-3):347-58.
107. Alonso-Orgaz S, Moreno L, Macaya C, Rico L, Mateos-Cáceres PJ, Sacristán D, et al. Proteomic study of plasma from moderate hypercholesterolemic patients. *J Proteome Res*. 2006 Sep; 5(9):2301-8.
108. González Sánchez S. Efecto de las plaquetas en la expresión proteica de segmentos de aorta sana y preinflamada: un abordaje proteómico [tesis]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 2013. .
109. López Farré A, González Armengol J, Mateos-Cáceres PJ, Macaya C. Horizontes de la proteómica en el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad cardiovascular. *Clin Invest Arterioscl*. 2008; 20(4):164-72.
110. Tuszynski GP, Buck CA, Warren L. A two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) system using sodium dodecyl sulfate-PAGE in the first

- dimension. *Anal Biochem.* 1979; 93(2): 329-338.
111. Nakamura K, Okuya Y, Katahira M, Yoshida S, Wada S, Okuno M. Analysis of tubulin isoforms by two-dimensional gel electrophoresis using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in the first dimension. *J Biochem Biophys Methods.* 1992; 24(3-4): 195-203.
 112. Gordon JA, Jencks WP. The relationship of structure to the effectiveness of denaturing agents for proteins. *Biochemistry.* 1963; 2(1):47-57.
 113. Custodio A, López-Farré AJ, Zamorano-León JJ, Mateos-Cáceres PJ, Macaya C, Caldés T, et al. Changes in the expression of plasma proteins associated with thrombosis in BRCA1 mutation carriers. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012; 138(5):867-75.
 114. Chevallet M, Lescuyer P, Diemer H, van Dorsselaer A, Leize-Wagner E, Rabilloud T. Alterations of the mitochondrial proteome caused by the absence of mitochondrial DNA: A proteomic view. *Electrophoresis.* 2006; 27(8): 1574-83.
 115. Rabilloud T. Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis.* 1990; 11(10): 785-94.
 116. Guerrero IC, Kleiner O. Application of mass spectrometry in proteomics. *Biosci Rep.* 2005; 25(1-2): 71-93.
 117. Marques M, Sacristán D, Mateos-Cáceres PJ, Herrero J, Arribas MJ, González-Armengol JJ, et al. Different protein expression in normal and dysfunctional

- platelets from uremic patients. *J Nephrol.* 2010; 23(1):90-101.
118. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985; 150(1): 76-85.
119. Cho BS, Roelofs KJ, Ford JW, Henke PK, Upchurch GR. Decreased collagen and increased matrix metalloproteinase-13 in experimental abdominal aortic aneurysms in males compared with females. *Surgery.* 2010; 147(2): 258-67.
120. Mateos-Cáceres PJ, García-Méndez A, López-Farré A, Macaya C, Núñez A, Gómez J, et al. Proteomic analysis of plasma from patients during an acute coronary syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2004; 44(8): 1578-83.
121. Molero L, García-Méndez A, Alonso-Orgaz S, Carrasco C, Macaya C, López-Farré AJ. Proteomic approach to identify changes in protein expression modified by 17beta-oestradiol in bovine vascular smooth muscle cells. *Clin Sci (Lond).* 2005; 109(5): 457-63.
122. Alonso-Orgaz S, Moreno L, Macaya C, Rico L, Mateos-Cáceres PJ, Sacristán D, et al. Proteomic study of plasma from moderate hypercholesterolemic patients. *J Proteome Res.* 2006; 5(9): 2301-8.
123. Modrego J, Maroto L, Tamargo J, Azcona L, Mateos-Cáceres P, Segura A, et al. Comparative expression of proteins in left and right atrial appendages from patients with mitral valve disease at sinus rhythm and atrial fibrillation. *J*

Cardiovasc Electrophysiol. 2010; 21(8): 859-68.

124. Mateos-Cáceres PJ, Macaya C, Azcona L, Modrego J, Mahillo E, Bernardo E, et al.
Different expression of proteins in platelets from aspirin-resistant and aspirin-sensitive patients. *Thromb Haemost.* 2010; 103(1): 160-70.
125. Boersma E, Harrington RA, Moliterno DJ, White H, Thérout P, Van de Werf F, et al.
Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors in acute coronary syndromes: a meta-analysis of all major randomised clinical trials. *Lancet.* 2002; 359(9302): 189-98.
126. López-Farré A, Rodríguez-Feo JA, García-Colis E, Gomez J, Lopez-Blaya A, Fortes J, et al.
Reduction of the soluble cyclic GMP vasorelaxing system in the vascular wall of stroke-prone spontaneously hypertensive rats: effect of the α_1 -receptor blocker doxazosin. *J Hypertens.* 2002; 20(3): 463-70.
127. Farina A, Chambery A, Esposito S, Agozzino L, Cotrufo M, Della Corte A, et al.
Proteomic profiling of medial degeneration in human ascending aorta. *Clin Biochem.* 2010; 43(4-5): 387-96.
128. Urbonavicius S, Lindholt JS, Vorum H, Urbonaviciene G, Henneberg EW, Honoré B.
Proteomic identification of differentially expressed proteins in aortic wall of patients with ruptured and nonruptured aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2009; 49(2): 455-63.
129. Kang SW, Chae HZ, Seo MS, Kim K, Baines IC, Rhee SG. Mammalian peroxiredoxin isoforms can reduce hydrogen peroxide generated in response to growth factors

- and tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* 1998; 273(11): 6297-302.
130. Kim H, Lee TH, Park ES, Suh JM, Park SJ, Chung HK, et al. Role of peroxiredoxins in regulating intracellular hydrogen peroxide and hydrogen peroxide-induced apoptosis in thyroid cells. *J Biol Chem.* 2000; 275(24): 18266-70.
 131. Miller FJ, Sharp WJ, Fang X, Oberley LW, Oberley TD, Weintraub NL. Oxidative stress in human abdominal aortic aneurysms: a potential mediator of aneurysmal remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22(4): 560-5.
 132. Peppin GJ, Weiss SJ. Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; 83(12): 4322-6.
 133. Imai K, Shikata H, Okada Y. Degradation of vitronectin by matrix metalloproteinases-1, -2, -3, -7 and -9. *FEBS Lett.* 1995; 369(2-3): 249-51.
 134. Urbonavicius S, Lindholt JS, Delbosc S, Urbonaviciene G, Henneberg EW, Vorum H, et al. Proteins associated with the size and expansion rate of the abdominal aortic aneurysm wall as identified by proteomic analysis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2010; 11(4): 433-41.
 135. Ghosh J, Murphy MO, Turner N, Khwaja N, Halka A, Kielty CM, et al. The role of transforming growth factor beta1 in the vascular sytem. *Cardiovasc Pathol.* 2005; 14(1): 28-36.
 136. Fukui D, Miyagawa S, Soeda J, Tanaka K, Urayama H, Kawasaki S. Overexpression of transforming growth factor beta1 in smooth muscle cells of human abdominal

- aortic aneurysm. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2003; 25(6): 540-5.
137. Al-Barjas HS, Ariëns R, Grant P, Scott J. Raised plasma fibrinogen concentration in patients with abdominal aortic aneurysm. *Angiology.* 2006; 57(5): 607-14.
138. Satta J, Haukipuro K, Kairaluoma MI, Juvonen T. Aminoterminal propeptide of type III procollagen in the follow-up of patients with abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1997; 25(5): 909-15.
139. Dastoor Z, Drever JL. Potential role of nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in apoptosis and oxidative stress. *J Cell Sci.* 2001; 114(Pt 9): 1643-53.
140. Simoni G, Gianotti A, Ardia A, Baiardi A, Galleano R, Civalleri D. Screening study of abdominal aortic aneurysm in a general population: lipid parameters. *Cardiovasc Surg.* 1996; 4(4): 445-8.
141. Gomme PT, Bertolini J. Therapeutic potential of Vitamin D-binding protein. *Trends Biotechnol.* 2004; 22(7): 340-5.
142. Lindholt JS, Stovring J, Ostergaard L, Urbonavicius S, Henneberg EW, Honoré B, et al. Serum antibodies against *Chlamydia pneumoniae* outer membrane protein cross-react with the heavy chain of immunoglobulin in the wall of abdominal aortic aneurysms. *Circulation.* 2004; 109(17): 2097-102.
143. Ando T, Nagai K, Chikada M, Okamoto K, Kurokawa M, Kobayashi T, et al. Proteomic analyses of aortic wall in patients with abdominal aortic aneurysm. *J*

- Cardiovasc Surg (Torino). 2011; 52(4): 545-55.
144. Harter JP, Gross BH, Callen PW, Barth RA. Ultrasonic evaluation of abdominal aortic thrombus. J Ultrasound Med. 1982; 1(8): 315-8.
145. Vorp DA, Lee PC, Wang DH, Makaroun MS, Nemoto EM, Ogawa S, et al. Association of intraluminal thrombus in abdominal aortic aneurysm with local hypoxia and wall weakening. J Vasc Surg. 2011; 34(2): 291-9.
146. Schütte HE. Changes in the vasa vasorum of the atherosclerotic aortic wall. Angiologica. 1968; 5(3): 210-22.
147. Pagano MB, Zhou HF, Ennis TL, Wu X, Lambris JD, Arkinson JP, et al. Complement-dependent neutrophil recruitment is critical for the development of elastase-induced abdominal aortic aneurysm. Circulation. 2009; 119(13): 1805-13.
148. Molacek J, Mares J, Treska V, Houdek K, Baxa J. Proteomic analysis of the abdominal aortic aneurysm wall. Surg Today. 2014; 44(1): 142-51.
149. Menashi S, Campa JS, Greenhalgh RM, Powell JT. Collagen in abdominal aortic aneurysm: typing, content, and degradation. J Vasc Surg. 1987; 6(6): 578-82.
150. Rizzo RJ, McCarthy WJ, Dixit SN, Lilly MP, Shively VP, Flinn WR, et al. Collagen types and matrix protein content in human abdominal aortic aneurysms. J Vasc Surg. 1989; 10(4): 365-73.
151. He CM, Roach MD. The composition and mechanical properties of abdominal

- aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1994; 20(1): 6-13.
152. Sumner DS, Hokanson DE, Strandness DE. Stress-strain characteristics and collagen-elastin content of abdominal aortic aneurysms. *Surg Gynecol Obstet.* 1970; 130(3): 459-66.
153. McGee GS, Baxter BT, Shively VP, Chisholm R, McCarthy WJ, Flinn WR, et al. Aneurysm or occlusive disease -- factors determining the clinical course of atherosclerosis of the infrarenal aorta. *Surgery.* 1991; 110(2): 370-5.
154. Dubick MA, Hunter GC, Perez-Lizano E, Mar G, Geokas MC. Assessment of the role of pancreatic proteases in human abdominal aortic aneurysms and occlusive disease. *Clin Chim Acta.* 1988; 177(1): 1-10.
155. Campa JS, Greenhalgh RM, Powell JT. Elastin degradation in abdominal aortic aneurysms. *Atherosclerosis.* 1987; 65(1-2): 13-21.
156. Powell J, Greenhalgh RM. Cellular, enzymatic and genetic factors in the pathogenesis of abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 1989; 9(2): 297-304.
157. Ishii H, Yoshida M, Hiraoka M, Hajjar KA, Tanaka A, Yasukochi Y, et al. Recombinant annexin II modulates impaired fibrinolytic activity in vitro and in rat carotid artery. *Circ Res.* 2001; 89(12): 1240-5.
158. Shin IS, Kim JM, Kim JL, Jang SY, Jeon ES, Choi SH, et al. Early growth response factor-1 is associated with intraluminal thrombus formation in human aortic aneurysm. *J Am Coll Cardiol.* 2009; 53(9): 792-9.

159. Hans SS, Jareunpoon O, Balasubramaniam M, Zelenock GB. Size and location of thrombus in intact and ruptured abdominal aortic aneurysms. *J Vasc Surg.* 2005; 41(4): 584-8.
160. Modrego J, Moñux G, Mateos-Cáceres PJ, Martínez-López I, Segura A, Zamorano-León JJ, et al. Effects of platelets on the protein expression in aortic segments: A proteomic approach. *J Cell Biochem.* 2010; 111(4): 889-98.
161. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995; 184(1): 39-51.
162. Mateos-Cáceres PJ, López-Farré AJ, Morata PC, Ramos-Pozo P, Macaya C, Serrano FJ, et al. Pravastatin increases the expression of the tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 and the oncogene Bax in human aortic abdominal aneurysms. *Can J Physiol Pharmacol.* 2008; 86(7): 431-7.
163. Makita S, Ohira A, Tachieda R, Itoh S, Moriai Y, Niinuma H, et al. Dilation and reduced distensibility of carotid artery in patients with abdominal aortic aneurysms. *Am Heart J.* 2000; 140(2): 297-302.
164. Nakamura F, Stossel TP, Hartwig JH. The filamins: organizers of cell structure and function. *Cell Adh Migr.* 2011; 5(2): 160-9.
165. Guo DC, Papke CL, He R, Milewicz DM. Pathogenesis of thoracic and abdominal

- aortic aneurysms. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1085(1): 339-52.
166. Yamanouchi D, Morgan S, Stair C, Seedial S, Lengfeld J, Kent KC, et al. Accelerated aneurysmal dilation associated with apoptosis and inflammation in a new developed calcium phosphate rodent abdominal aortic aneurysm model. *J Vasc Surg.* 2012; 56(2): 455-61.
167. Fan J, Li X, Yan YW, Tian XH, Hou WJ, Tong H, et al. Curcumin attenuates rat thoracic aortic aneurysm formation by inhibition of the c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptosis. *Nutrition.* 2012; 28(10): 1068-74.
168. Takagi Y, Ishikawa M, Nozaki K, Yoshimura S, Hashimoto N. Increased expression of phosphorylated c-Jun amino-terminal kinase and phosphorylated c-Jun in human cerebral aneurysms: role of the c-Jun amino-terminal kinase/c-Jun pathway in apoptosis of vascular walls. *Neurosurgery.* 2002; 51(4): 997-1002.
169. Riches K, Angelini TG, Mudhar GS, Kaye J, Clark E, Bailey MA, et al. Exploring smooth muscle phenotype and function in a bioreactor model of abdominal aortic aneurysm. *J Transl Med.* 2013; 11(208): 1-13.
170. Jacob T, Hingorani A, Ascher E. Examination of the apoptotic pathway and proteolysis in the pathogenesis of popliteal artery aneurysms. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2001; 22(1): 77-85.
171. Kadirvel R, Ding YH, Dai D, Lewis DA, Kallmes DF. Intrinsic pathway-mediated apoptosis in elastase-induced aneurysms in rabbits. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010;

31(1): 165-9.

172. Kallmes DF, Fujiwara NH, Yuen D, Dai D, Li ST. A collagen-based coil for embolization of saccular aneurysms in a New Zealand White rabbit model. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2003; 24(4): 591-6.

RESUMEN

CAMBIOS ESTRUCTURALES EN LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL. ESTUDIO PROTEÓMICO

INTRODUCCIÓN

Los aneurismas de aorta abdominal (AAA) constituyen una grave patología aórtica cuya ruptura conlleva una elevada mortalidad. Aunque su etiopatogenia no se conoce con exactitud, en los aneurismas de aorta abdominal se produce una inflamación con infiltrado leucocitario en las capas media y adventicia de la pared aórtica, activación de las metaloproteinasas y desestructuración de la matriz extracelular, así como un aumento de la actividad apoptótica.

HIPÓTESIS

Al comparar el tejido aórtico aneurismático con el tejido aórtico sano, es previsible que existan variaciones en los niveles de expresión proteica de las proteínas que componen la matriz extracelular, las proteínas estructurales que

componen o interactúan con el citoesqueleto y/o las proteínas implicadas en la apoptosis celular.

OBJETIVOS

El objetivo de este estudio consiste en determinar si existen diferencias en los niveles de expresión proteica de las principales proteínas de la matriz extracelular y las proteínas que componen el citoesqueleto, así como comprobar si en los aneurismas de aorta abdominal existe una actividad apoptótica mayor, a través de la cuantificación de las proteínas Bcl-2 y caspasa-3.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se obtuvieron muestras de tejido aórtico aneurismático en quirófano, procedente de 13 pacientes intervenidos de manera electiva por aneurisma de aorta abdominal infrarrenal. Asimismo, se obtuvieron muestras de tejido aórtico sano en 12 pacientes con daño cerebral irreversible, candidatos a ser donantes de órganos. Para llevar a cabo la identificación de la expresión proteica diferencial entre ambas muestras, éstas se analizaron mediante electroforesis bidimensional, espectrometría de masas, Western-blot y ELISA. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS 16.0.

RESULTADOS

No se han encontrado diferencias entre ambos grupos respecto a factores de riesgo cardiovascular o sexo, aunque sí se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en la edad (grupo AAA: 69.31 ± 4.38 años, grupo control: 53.91 ± 8.30 años, $p=0.001$) y el diámetro aórtico (grupo

AAA: 6.73 ± 0.4 cm, grupo control: <2 cm, $p=0.001$). Respecto a las proteínas de la matriz extracelular, se ha encontrado una disminución significativa en los niveles de expresión de elastina en las muestras de AAA (grupo AAA: 3934.25 ± 4463.40 UA, grupo control: 31400.25 ± 15449.50 UA, $p=0.04$; UA = Unidades Arbitrarias de Densitometría). En cuanto a las proteínas del citoesqueleto, hemos observado niveles aumentados de filamina en las muestras de AAA (grupo AAA: 390.34 ± 78.36 UA, grupo control: 250.00 ± 43.45 UA, $p=0.041$), y niveles de expresión disminuidos del isotipo 1 de la glicoproteína asociada a microfibrillas - 4 (grupo AAA: 32.31 ± 13.77 UA, grupo control: 155.29 ± 44.41 UA, $p=0.016$), isotipo 1 de la anexina A5 (grupo AAA: 259.75 ± 33.1 UA, grupo control: 430.66 ± 40.51 UA, $p=0.012$) y anexina A2 (grupo AAA: 59.92 ± 15.58 UA, grupo control: 192.20 ± 34.70 UA, $p=0.018$). Por último, los niveles de las proteínas caspasa-3 y Bcl-2, relacionadas con la apoptosis celular, se encontraron aumentados en las muestras de AAA respecto a los controles, aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística.

CONCLUSIONES

En los aneurismas de aorta existe una disminución significativa de los niveles de expresión de elastina, glicoproteína asociada a microfibrillas - 4 (isotipo 1), anexina A5 (isotipo 1) y anexina A2. También se ha encontrado un aumento significativo de los niveles de expresión de filamina en el tejido aórtico aneurismático. Dos de las proteínas relacionadas con la apoptosis (caspasa-3 y Bcl-2) también presentaban una expresión aumentada en los AAA, pero este aumento no alcanzó la significación estadística.

SUMMARY

STRUCTURAL CHANGES IN THE ABDOMINAL AORTIC ANEURYSMS. A PROTEOMIC STUDY.

INTRODUCTION

The abdominal aortic aneurysm (AAA) is a severe aortic pathology, which rupture is associated with a high mortality. Although its etiopathogenesis is not well known, in the abdominal aortic aneurysms there's inflammation with leukocyte infiltrate, metalloproteinases activation and degradation of the extracellular matrix, as well as an increase in the apoptotic activity.

HYPOTHESIS

If the aneurysmal aortic tissue is compared with the healthy aortic tissue, differences in the expression of proteins of the extracellular matrix are expected, as well as the proteins composing the cytoskeleton or interacting with it, and / or the proteins involved in cell apoptosis.

OBJETIVES

The purpose of this study was to establish whether differences exist in the expression levels of the main proteins of the extracellular matrix and cytoskeletal proteins, as well as to test if there's an increase in apoptotic activity in the abdominal aortic aneurysms, through quantification of Bcl-2 and caspase-3 proteins.

MATERIAL AND METHODS

Aneurysmal aortic tissue samples were obtained in the operating room, from 13 patients during elective repair of the abdominal aortic aneurysm. Control aortic tissue samples were obtained from 12 patients with irreversible brain injury, candidates for organ donors. To identify the differential expression of the proteins between both types of samples, they were analyzed using two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry, Western-blot and ELISA. Statistical analysis was performed using SPSS 16.0 software.

RESULTS

We found no differences in the distribution of cardiovascular risk factors or sex between both groups; age was significantly higher in the AAA group (AAA group: 69.31 ± 4.38 years, control group: 53.91 ± 8.30 years, $p=0.001$) and so was the aortic diameter (AAA group: 6.73 ± 0.4 cm, control group: <2 cm, $p=0.001$). Regarding the extracellular matrix proteins, levels of elastin expression were significantly lower in AAA samples (AAA group: 3934.25 ± 4463.40 AU, control group: 31400.25 ± 15449.50 AU, $p=0.04$; AU = Arbitrary Units of Densitometry). With reference to cytoskeletal proteins, we've observed higher levels of filamin in AAA samples (AAA group: 390.34 ± 78.36 AU, control group: 250.00 ± 43.45 AU, $p=0.041$) and lower expression levels of microfibril-

associated glycoprotein-4 isotype 1 (AAA group: 32.31 ± 13.77 AU, control group: 155.29 ± 44.41 AU, $p=0.016$), annexin A5 isotype 1 (AAA group: 259.75 ± 33.1 AU, control group: 430.66 ± 40.51 AU, $p=0.012$) and annexin A2 (AAA group: 59.92 ± 15.58 AU, control group: 192.20 ± 34.70 AU, $p=0.018$). Finally, caspase-3 and Bcl-2 protein levels, related with cell apoptosis, were higher in AAA samples than control ones, although the difference did not reach statistical significance.

CONCLUSIONS

In the aortic aneurysms there's a significant lower expression of elastin, microfibril-associated glycoprotein-4 (isotype 1), annexin A5 (isotype 1) and annexin A2. Filamin expression levels were found significantly higher in the aneurysmal aortic tissue. Two of the apoptosis related proteins (caspase-3 and Bcl-2) also had an increased expression in the AAA samples, but this increase didn't reach statistical significance.

